QuanTtest Red Total Protein Assay System — Pyrogallol Red

LOT 21220 | REF 5210-12 | IVD | 2013-12 | CE

Intended Use
The quanTtest red Total Protein Assay System is intended for the quantitative determination of protein in cerebrospinal fluid and urine for both manual and automated systems.

Summary and Explanation
Determination of total protein in urine and cerebrospinal fluid is valuable in the diagnosis of renal and central nervous system disorders respectively. Urinary protein elevations are commonly seen in the following conditions: strenuous exercise, fever and hypothermia, monoclonal gammopathies, nephritis, nephrosis and diabetic nephropathy, and urinary tract infections. Determination of total protein in cerebrospinal fluid aids in the diagnosis of such conditions as meningitis, encephalitis, poliomyelitis, neurosyphilis, CNS tumors and cerebral hemorrhage.[1]

The quanTtest red Total Protein Assay System provides a simple method of protein quantitation using microliter samples of urine or cerebrospinal fluid. Total Protein is measured by the dye binding method using a complex of pyrogallol red and molybdenum acid (Mo^{+6}) described by Fujita et al[2]. At low pH the dye is red and changes to blue when complexed with protein.

Depending on the equipment and sample size used, a linear response is attained up to 350 mg/dL. The Pyrogallol Red dye binding method can be read at three minutes making the test suitable for automated instrumentation. The sensitivity of the Pyrogallol Red method makes the test appropriate for use with body fluids such as cerebrospinal fluid and urine which have protein concentrations too low for precise measurement by other protein methods.

The biuret method is not sensitive enough for protein determinations in urine. Results with turbidimetric methods may vary depending on the type and concentration of the precipitant, the type of protein, the temperature and the time before reading. Some drugs have been shown to interfere with turbidimetric methods.[3,4] The quanTtest red method has a greater range of linearity than the Coomassie Blue method.

Globulin as well as albumin can be measured with the quanTtest red Reagent. Surfactants, copper or iron ions interfere with test results. Samples exhibiting hematuria will give falsely elevated values. This method lessens cuvette staining and can be adapted to automated analyzers.

Principle of the Procedure
The assay is based upon the interaction of protein with the Pyrogallol Red-molybdate complex. Pyrogallol Red is combined with molybdenum acid in the Reagent forming a red complex with a maximum absorbance at 470 nm. Under the conditions of the test, in the presence of protein, a blue-purple color is formed and the maximum absorption of the dye changes from 470 nm to 604 nm. The concentration of the total protein in the sample can be measured by reading the absorbance of the sample at 600 nm. The color response is linear and permits accurate protein determinations.

Reagents
1. quanTtest red **Reagent** is supplied as a ready-to-use liquid in 250 mL bottles containing Pyrogallol Red (0.020 g/L), Sodium Molybdate (0.06 g/L), Succinic Acid (4.8 g/L), Sodium Benzoate (0.4 g/L), Sodium Oxalate (0.25 g/L), Methanol 12 mL/L and Surfactant.
2. **Protein Standard Solution Set** packaged in 30 mL dropper bottles is supplied in four protein concentrations of 25, 50, 100, and 200 mg/dL as an aqueous solution of 70% human serum albumin and 30% human serum globulin in borate buffered saline. (See accompanying Human Protein Standards package insert). Sodium azide has been added as a preservative.
3. **Liquid Spinal Fluid Controls**, Levels 1 and 2, supplied 3 mL per bottle. (See accompanying Spinal Fluid Control package insert). Sodium azide has been added as a preservative.
4. **Liquid Human Urine Controls**, Levels 1 and 2, supplied 10 mL per bottle. (See accompanying Urine Control package insert). Sodium azide has been added as a preservative.
5. **Graph Paper**
6. **Direction Insert** (applicable products listed below)

Product	Catalog No.	Contents
quanTtest red Reagent	5210-12	1 x 250 mL
quanTtest red Total Protein System	2210-02	200 Test
Reagent		2 x 250 mL
Standards 25, 50, 100, 200 mg/dL		1 x 30 mL each
Spinal fluid control Level 1 and 2		1 x 3 mL each
Urine control Level 1 and 2		1 x 10 mL each

Materials Required but Not Provided
1. Pipets capable of delivering 20 µL or 50 µL, and 2.5 mL.
2. Reaction tubes: 13 x 100 mm culture tubes are recommended.
3. Spectrophotometer capable of reading absorbance at 600 nm.
4. Cuvette: glass or disposable plastic.
5. Distilled or deionized water.

Instrumentation
The quanTtest red Total Protein Assay System requires the use of a manual or automated spectrophotometer capable of measuring absorbance at 600 nm. Refer to the instrument manufacturer's manual for specific instruction regarding its operation and use. Automated analyzer applications are available upon request from Quantimetrix' Technical Service Department.

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

Warnings and Precautions
The quanTtest red Reagent is formulated with acidic methanol. Do not take internally. Do not get in eyes, on skin or on clothing. In case of contact, immediately flush eyes with water and get medical attention. Wash skin with soap and water. Do not pipet by mouth.

The Standards and Controls are formulated from human source material. All blood donor units comprising the serum source material have been tested and found non-reactive for HCV, Hepatitis B surface antigen and HIV antibody when tested by FDA accepted methods. **POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL**. No known test method can assure that a product derived from human blood does not contain Hepatitis or HIV virus. It is recommended such samples be handled according to the Centers for Disease Control's Bio–Safety Level 2 recommendations.

Dispose of any discarded materials in accordance with the requirements of your local waste management authorities.

Reconstitution of Reagents
Reagent
The quanTtest red Reagent needs no reconstitution or dilution. Remove the Reagent from the refrigerator and aliquot a sufficient quantity of Reagent for the number of tests to be performed. Allow the aliquot to come to room temperature (18-25 C) before use.

Standards and Controls
Remove the Standards and Controls from the refrigerator and allow to come to room temperature (18-25 C), approximately 30 minutes before use. The Standards and Controls need no reconstitution. Gently invert the Standards and Controls to assure homogeneity of the contents. Avoid foaming.

Storage and Stability
Reagent
1. Store the quanTtest red Reagent at 2-8 C tightly capped. Protect from light.
2. When stored properly the Reagent is stable until the expiration date stated on the label. Do not use the Reagents past the expiration date stated on each Reagent container label.
3. Discard the Reagent if signs of precipitation or cloudiness develop.

Standards and Controls
1. The Standards and Controls should be stored at 2-8 C.
2. When stored at 2-8 C between uses, the Standards and Controls are stable until the expiration date stated on the label. Do not use the Standards and Controls past the expiration date stated on each label.
3. Discard the standards or controls if turbid or any evidence of microbial contamination is present.

Specimen Handling
1. Remove the samples to be tested from the refrigerator and allow to come to room temperature (18-25 C) before testing.
2. Urine or cerebrospinal fluid samples may be suitable for use without additional sample preparation. No special preservatives are required.
3. Should any blood cells or cellular debris be present in either the urine or spinal fluid specimen, centrifuge the specimen prior to testing.
4. Urinary protein may be determined on a 24-hour collection or on a random specimen.
5. Urine specimens may be stored at 2-8 C for up to 24 hours or frozen up to 3 months until assayed. CSF specimens may be stored at 2-8 C for several days or frozen for months until assayed.

Procedure
The protein concentration of unknown specimens can be determined by finding the absorbance of the specimen on a standard curve and reading the corresponding protein concentration or can be calculated using a one point calibration (see Calculation of Results below).

To prepare the standard curve, plot the absorbance obtained for each standard against its respective protein concentration in mg/dL.

If using the calculation method to determine the protein concentration of unknown specimens, use the standard that approximates the concentration of the specimen being tested; e.g., when testing normal CSF specimens measure the 50 mg/dL standard and when testing normal urine specimens measure the 25 mg/dL standard. If the protein concentration of the specimen is higher or lower than these concentrations, use the standard which most closely approximates the protein concentration of the specimen.

Protein can be measured using either a 20 or a 50 µL sample size. The 50 µL sample will give a linear range to 150 mg/dL of protein. To extend the range of linearity of the test method to 350 mg/dL of protein, use a 20 µL sample size (see Limitations section below).

Test Procedure
1. Allow quanTtest red Reagent, Standards, Controls, and Specimens to come to room temperature (18-25 C).
2. Label test tubes for each sample: Reagent Blank, Standards, Controls, and Patient

The following symbols are used in labeling for Quantimetrix Corporation.

CE European Conformity | LOT Lot Number | Manufactured by | IVD For in vitro diagnostic use | Biological Risk | Cont. Contents of kit | REF Catalog No. | See Product Insert | EC REP Authorized Representative | Store at | Use by (last day of month)

Quantimetrix 2005 Manhattan Beach Blvd. Redondo Beach CA 90278-1205 USA • +1.310.536.0006 FAX +1.310.536.9977 • www.4qc.com • **MO21022A-12/10**

Specimens to be tested.
3. Pipet 50 µL (20 µL) of each sample into the appropriate tube. Use distilled or deionized water for the Reagent Blank tube.
4. Accurately pipet 2.5 mL of the Reagent to each of the tubes. Mix well by vortexing or agitating the tubes.
5. Allow reaction mixture to stand at room temperature for at least 15 minutes before reading the A_{600}. The color of the reaction mixture is stable for up to 60 minutes.
6. Transfer the Reagent blank to a clean cuvette and adjust the spectrophotometer to read zero at 600 nm.
   NOTE: If the cuvette becomes stained in step 6, dye has adsorbed onto the glass and must be cleaned or erroneously high results will occur. After cleaning, thoroughly rinse with distilled or deionized water and dry. Repeat Step 6.
7. Read each sample against the Reagent blank and record the absorbance values obtained.
8. If preparing a standard curve, plot the absorbance of each standard against its protein concentration on the graph paper provided. Draw the "best fit" straight line through the points. Determine the protein concentration of unknown patient specimens by finding the absorbances on the standard curve and reading the corresponding protein concentrations. If calculating the results, follow the example in the **Calculation of Results** section below.

Automated Instrumentation Methods
The quanTtest red Total Protein Assay System has been evaluated for efficacy when each reaction is read at precisely timed 3 minute intervals, making the method suitable for automated instrumentation. Refer to the specific instrument applications for the Pyrogallol Red method for direction of use of this product. Contact Quantimetrix' Technical Service Department or your instrument manufacturer for these applications.

Calculation of Results
The concentrations of urine or CSF proteins are expressed in mg/dL. The protein concentration of unknown samples can be determined by finding the absorbance of the sample on the standard curve and reading the corresponding protein concentration **OR** can be calculated as follows:

Calculation of Total Protein
Use the following formula to calculate protein concentrations of the patient samples.

$$\textbf{Protein Concentration (mg/dL)} = \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of standard}} \times \textbf{Concentration of std. (mg/dL)}$$

The following are examples for illustrative purposes only.

Cerebrospinal Fluid
CSF Patient Specimen A_{600} = 0.200
50 mg/dL Standard A_{600} = 0.310
(0.200 / 0.310) X 50 mg/dL = 32.3 mg/dL

Urine
Urine Patient Specimen A_{600} = 0.120
25 mg/dL Standard A_{600} = 0.165
(0.120 / 0.165) X 25 mg/dL = 18.2 mg/dL

Calculation of 24 Hour Urinary Protein
1. Measure the 24 hour urine volume (mL).
2. Divide this volume by 100 to determine the volume expressed in deciliters (dL).
3. Multiply the 24 hour urine volume in dL by the protein concentration in mg/dL as determined by quanTtest red procedure.
4. The resulting number is the amount of protein expressed as mg per 24 hours.

The following is an example for illustrative purposes only.

Patient Urine Volume = 1,550 mL
Patient Urinary Protein = 18.2 mg/dL
(1550 mL / 100 mL/dL) X 18.2 mg/dL = 282.1 mg/24 hours

Quality Control
A quality control program is recommended for all clinical laboratories. The analysis of control material with assayed values in both the normal and abnormal ranges is recommended for monitoring the performance of the procedure. The values recovered for the controls should fall within the laboratory's acceptable range. A Quality Control Program, quantrol™, is available from Quantimetrix. Please inquire.

Limitations
Linearity of the test method is 150 mg/dL of total protein when using a 50 µL sample size. Linearity may be extended by decreasing the specimen volume to 20 µL. The total protein concentration then becomes linear to 350 mg/dL. Greater accuracy may be obtained by diluting specimens of higher protein levels to approximately 100 mg/dL with distilled or deionized water, reassaying and correcting for the dilution factor when calculating the total protein concentration.

Some types of surface active agents may affect the color. Cationic surfactants in general, give the same color as proteins. Because anions inhibit the color reaction, wash the equipment thoroughly, using distilled water, until no surface active agent remains. Dry equipment thoroughly before using.

Hemoglobin gives about one-half the color reaction of albumin. Samples exhibiting hematuria will give a falsely elevated value.

Copper and iron ions can cause errors in measurement. Special care should be taken to avoid contamination of the apparatus.

The Reagent contains light sensitive components. Protect from light.

The quanTtest red system may underestimate low molecular weight proteins and immunoglobulin lightchains (Bence Jones Proteins).

In routine use, cuvettes, culture tubes and equipment are rarely stained. However, when many specimens are run at the same time or if a specimen containing a high concentration of protein is tested, some of the dye may remain. If this occurs, clean glassware and equipment thoroughly.

Technical updates can be found on our website.

Expected Values
Normal ranges may vary according to patient population and laboratory conditions. Each laboratory should establish its own normal range. Using the Pyrogallol Red method on specimens from clinically healthy subjects, protein levels in cerebrospinal fluid can be expected to range from 15 to 45 mg/dL and up to 60 mg/dL in healthy elderly subjects. Urinary excretion of protein is normally less than 200 mg/24 hours in volumes of 1,000 to 1,500 mL/24 hours. Random normal urine specimens may range from 0 to 20 mg/dL of protein.

Specific Performance Characteristics
Specificity
The specificity of the quanTtest red test method was determined by analysis of urine samples following the addition of potential interfering substances. Hemoglobin, iron and copper ions were found to interfere. See the table of interfering substances following.

Table of Interfering Substances

Additive Name	Added Conc. (mg/dL)	Measured Conc. of Total Protein (mg/dL)	Amount Normally Present in Urine
None	—	29	—
Urea Nitrogen	2,300	29	10.5 g/day
Uric Acid	300	30.5	250-750 mg/day
Creatinine	300	28.5	male 1000-1700 mg/day female 1175-1468 mg/day
Ammonia	250	30	0.41 - 0.82 g/day
Glucose	5,000	28	30 - 130 mg/day
Ascorbic Acid	200	28.5	0.1 - 0.4 mg/kg/day
Glutathione	50	29	—
Citric Acid	200	29.5	0.3 - 0.9 mg/day
Oxalic Acid	100	26	15 - 30 mg/day
Tartaric Acid	200	28	—
Na	600	30	6 - 8.4 g/day
K	250	28	1.8 - 2 g/day
Cl	1,000	30	11.1 - 18.2 g/day
Ca	100	30	240 - 320 mg/day
Mg	30	29	70 - 155 mg/day
P	200	33	—
Cu	10	39	250 µg/day
Fe^{2+}	10	36.5	60 -100 µg/day
Bilirubin	20	30.5	3.08 ± 0.28 mg/day

Precision
The precision of the quanTtest red System was established by analyzing a series of Quantimetrix Urine and Spinal Fluid Controls. The assay was calibrated with Quantimetrix standards as included in the kit. The reaction was read at 3 minutes and after 15 minutes on a Gilford Stasar II spectrophotometer.

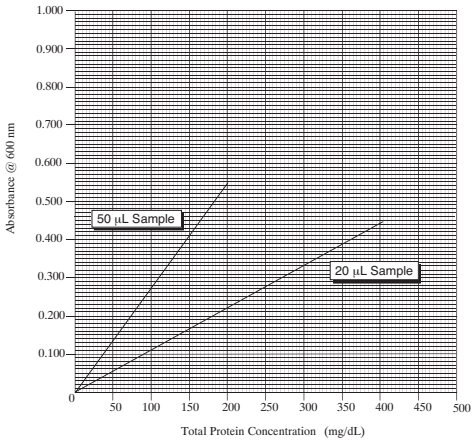
When read at 3 minutes:

	Within Run (n=10)			Between Run (n=18)		
	Mean (mg/dL)	SD	%CV	Mean (mg/dL)	SD	%CV
Urine Level 1	15.3	2.3	14.9	14.9	1.3	8.7
Urine Level 2	62.5	2.5	4.0	61.8	2.5	4.1
CSF Level 1	36.3	2.9	7.9	35.3	3.3	9.4
CSF Level 2	66.7	2.1	3.2	65.2	3.3	5.1

When read after 15 minutes:

	Within Run (n=10)			Between Run (n=18)		
	Mean (mg/dL)	SD	%CV	Mean (mg/dL)	SD	%CV
Urine Level 1	15.2	0.4	2.6	15.5	1.3	7.5
Urine Level 2	63.3	3.0	4.8	62.8	1.9	3.1
CSF Level 1	36.7	2.6	7.2	35.9	3.4	9.5
CSF Level 2	69.6	2.6	3.7	68.0	2.6	3.9

Example Graph



Correlation
Comparison of the quanTtest red method with a Coomassie Blue method (Quantimetrix) for protein determination gives the following correlation when tested using 29 patient urine samples.

n=29	Mean	Correlation Coefficient (r)	Slope	Intercept
Coomassie Blue	43.04	0.9923	1.05	-0.18
quanTtest red	45.20			

References

1. Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. CV Mosby Co, 1987.
2. Fujita Y, Mori I, Kitano S. Bunseki Kagaku 1983;32:379.
3. Lievens MM, Celis PJ. Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine. Clin Chem 1982;28:2328.
4. Muir A, Hensley WJ. Pseudoproteinuria due to penicillins in the turbidimetric measurement of proteins with trichloroacetic acid. Clin Chem 1979;25:1662-1663.
5. Young GS et al. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1975;21:1D.
6. Martin EW. Hazard of Medication (Alexander SF, Farage, DJ, Hassan WE Jr. eds.) Philadelphia PA and Toronto Canada: JB Lippincott Co 1971:169-189.
7. Constantino NV, Kabat HF. Drug-induced modification for laboratory test values, revised 1973. Am J Hosp Pharm 1973;30:24.
8. Watanabe N, Makino K, Kamei S, Okubo A, Yamanaka M, Osawa S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
9. Yoshizaki H, Osawa S, Furuya S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 1976;72:248.
11. Kingsbury FB, Clark CP, Williams G, Post AL. J Lab Clin Med 1926;11:981.
12. Meulemans O. Clin Chem, Acta 1960;5:757.
13. Saito M, Kitamura M, Niwa M. Rinsho-kagaku-bunseki II. Tokyo Kagakudojin 1979:21.

QuanTtest Red Total Protein Assay System — Pyrogallol Red

LOT 21220 | REF 5210-12 | IVD | 2013-12 | CE

Verwendungszweck
Das quanTtest red Gesamtprotein-Assaysystem ist zum quantitativen Nachweis von Protein im Liquor cerebrospinalis und Urin für handbetriebene und automatische Nachweissysteme vorgesehen.

Zusammenfassung und Erklärung
Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Urin und Liquor ist ein wertvolles Hilfsmittel bei der Diagnose von Nieren- und Zentralnervensystemerkrankungen. Erhöhte Proteinwerte im Urin treten häufig bei den folgenden Zuständen auf: anstrengende sportliche Betätigung, Fieber und Unterkühlung, monoklonale Gammopathien, Nephritis und diabetische Nephropathie sowie Harnwegsinfektionen. Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Liquor unterstützt die Diagnose von Erkrankungen wie Meningitis, Enzephalitis, Poliomyelitis, Neurosyphilis, Liquortumoren und Gehirnblutungen.[1]

Das quanTtest red Gesamtprotein-Assaysystem ermöglicht den quantitativen Nachweis von Protein in Mikroliter-Proben von Urin oder Liquor. Der Gesamtproteingehalt wird durch Farbstoffbindung anhand eines Pyrogallolrot-Molybdänsäure-Komplexes (Mo^{+6}) ermittelt, der von Fujita et al[2] beschrieben wurde. Bei niedrigem pH-Wert ist der Farbstoff rot und schlägt bei Bindung mit Protein nach blau um.

Je nach verwendetem Gerät und verwendeter Probengröße wird eine lineare Reaktion bei bis zu 350 mg/dl erzielt. Die Pyrogallolrot-Farbstoffbindung kann nach drei Minuten abgelesen werden und ist somit für Laborautomaten geeignet. Durch die Empfindlichkeit des Pyrogallolrotverfahrens eignet sich der Test zur Verwendung mit Körperflüssigkeiten wie Liquor und Urin, deren Proteinkonzentrationen für andere Proteinnachweisverfahren zu gering sind.

Die Biuret-Methode ist zur Bestimmung von Protein im Urin nicht empfindlich genug. Durch turbidimetrische Verfahren ermittelte Ergebnisse können je nach Art und Konzentration des Präzipitats, Eiweißtyp, Temperatur und verstrichener Zeit vor dem Ablesen unterschiedlich ausfallen. Einige Medikamente können turbidimetrische Verfahren erwiesenermaßen verfälschen.[3,4] Das quanTtest red-Verfahren bietet einen größeren Linearitätsbereich als das Coomassie-Blue-Verfahren.

Globulin sowie Albumin können mit der quanTtest red Reagenzflüssigkeit gemessen werden. Tenside sowie Kupfer- und Eisenionen verfälschen die Testergebnisse. Urinproben mit Blutgehalt (Hämaturie) führen zu fälschlich erhöhten Werten. Dieses Verfahren verringert die Küvetteneinfärbung und kann für Analyseautomaten angepasst werden.

Verfahrensprinzip
Der Assay basiert auf der Reaktion zwischen dem Protein und dem Pyrogallolrot-Molybdat-Komplex. Pyrogallolrot wird in der Reagenzflüssigkeit mit Molybdänsäure kombiniert und bildet einen roten Komplex mit einer maximalen Extinktion von 470 nm. Unter Testbedingungen schlägt die Farbe bei Anwesenheit von Protein nach blauviolett um. Dabei erhöht sich die maximale Extinktion von 470 nm auf 604 nm. Die Gesamtproteinkonzentration der Probe kann durch Ablesen der Extinktion der Probe bei 600 nm ermittelt werden. Die Farbreaktion ist linear und ermöglicht genaue Bestimmungen des Proteingehalts.

Reagenzien
1. quanTtest red **Reagenz** ist als gebrauchsfertige Flüssigkeit in 250-ml-Fläschchen erhältlich und besteht aus Pyrogallolrot (0,020 g/l), Natriummolybdän (0,06 g/l), Succinsäure (4,8 g/l), Natriumbenzoat (0,4 g/l), Natriumoxalat (0,25 g/l), Methanol (12 ml/l) und Tensid.
2. **Eiweiß-Standardlösungsset** abgepackt in 30-ml-Pipettenfläschchen, ist in vier Eiweißkonzentrationen erhältlich (25, 50, 100, and 200 mg/dl) als wässrige Lösung von 70 %igem Humanserum-Albumin und 30 %igem Humanserum-Globulin in boratgepufferter Kochsalzlösung (siehe Packungsbeilage der Human-Proteinstandards). Natriumazid wurde als Konservierungsmittel hinzugefügt.
3. **Liquor-Flüssigkontrolle**, Level 1 und 2, im Lieferumfang enthalten 3 ml pro Fläschchen (siehe Packungsbeilage der Liquor-Kontrolle). Natriumazid wurde als Konservierungsmittel hinzugefügt.
4. **Humanurin-Flüssigkontrolle**, Level 1 und 2, 10 ml pro Fläschchen im Lieferumfang enthalten (siehe Packungsbeilage der Urin-Kontrolle). Natriumazid wurde als Konservierungsmittel hinzugefügt.
5. **Millimeterpapier**
6. **Anweisungsbeilage** (zutreffende Produkte siehe unten)

Produkt	Katalog-Nr.	Inhalt
quanTtest red Reagenz	5210-12	1 x 250 ml
quanTtest red Gesamtprotein-Assaysystem	2210-02	200 Test
Reagenz		2 x 250 ml
Standards 25, 50, 100, 200 mg/dl		je 1 x 30 ml
Liquor-Flüssigkontrolle Level 1 und 2		je 1 x 3 ml
Urin-Flüssigkontrolle Level 1 und 2		je 1 x 10 ml

Erforderliche Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)
1. Pipetten zur Abgabe von 20 µl oder 50 µl und 2,5 ml.
2. Reagenzgläser: 13 x 100 mm Kulturröhrchen werden empfohlen.
3. Spektrophotometer zum Ablesen der Extinktion bei 600 nm.
4. Küvette: Glas oder Plastik-Einmalprodukt.
5. Destilliertes oder deionisiertes Wasser.

Instrumente
Das quanTtest red Gesamtprotein-Assaysystem benötigt ein handbetriebenes oder automatisches Spektrophotometer, das Extinktionen bei 600 nm ermitteln kann. Die jeweiligen Herstelleranweisungen zu Betrieb und Anwendung beachten. Anweisungen für Analyseautomaten sind auf Anfrage vom technischen Kundendienst von Quantimetrix erhältlich.

Nur zur *In-vitro*-Diagnostik

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen
Das quanTtest red Reagenz ist mit angesäuertem Methanol angesetzt. Nicht schlucken oder einnehmen. Augen- und Hautkontakt sowie Kontakt mit der Kleidung vermeiden. Bei Kontakt sofort Augen mit Wasser ausspülen und ärztliche Hilfe einholen. Haut mit Wasser und Seife waschen. Nicht mundpipettieren.

Standards und Kontrollen wurden aus menschlichem Quellenmaterial hergestellt. Alle Spendereinheiten des Serumpools wurden getestet und unter Anwendung von FDA-zugelassenen Methoden als nicht reaktiv auf HCV-Antikörper und HBs-Antigen befunden. **POTENZIELL INGEKTIÖS**. Es gibt jedoch keine bekannten Testmethoden, die gewährleisten können, dass ein aus Humanblut hergestelltes Produkt keine Hepatitis- bzw. HIV-Viren enthält. Es wird empfohlen, solche Proben gemäß den Biosicherheitsempfehlungen der Stufe 2 der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde, Center for Disease Control, zu handhaben.

Die Entsorgung aller Abfälle ist nach den geltenden lokalen Abfallbestimmungen vorzunehmen.

Rekonstitution der Reagenzien
Reagenz
Das quanTtest red Reagenz erfordert keine Rekonstitution oder Verdünnung. Das Reagenz aus dem Kühlschrank nehmen und eine ausreichende Menge des Reagenzstoffes für die erforderlichen Tests bereitstellen. Die bereitgestellte Menge vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18 bis 25 C) bringen.

Standards und Kontrollen
Die Standards und Kontrollen aus dem Kühlschrank nehmen und ca. 30 Minuten lang auf Raumtemperatur (18 bis 25 C) aufwärmen lassen. Die Standards und Kontrollen brauchen nicht rekonstituiert zu werden. Standards und Kontrollen vorsichtig umdrehen, damit der Inhalt homogen wird. Nicht schäumen lassen.

Lagerung und Stabilität
Reagenz
1. Das quanTtest red Reagenz bei 2 bis 8 C fest verschlossen aufbewahren. Vor Lichteinwirkung schützen.
2. Bei korrekter Aufbewahrung ist das Reagenz bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Bei korrekter Aufbewahrung sind die Reagenzien bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil.
3. Das Reagenz bei Anzeichen von Trübung oder Präzipitation verwerfen.

Standards und Kontrollen
1. Die Standards und Kontrollen müssen bei 2 bis 8 C aufbewahrt werden.
2. Bei Lagerung bei 2 bis 8 C sind die Standards und Kontrollen bis zum auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil. Standards und Kontrollen nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
3. Falls die Standards oder Kontrollen trüb werden oder Anzeichen auf eine mikrobielle Verunreinigung vorliegen, müssen sie entsorgt werden.

Handhabung der Proben
1. Die Proben aus dem Kühlschrank nehmen und vor dem Testen auf Raumtemperatur (18 bis 25 C) bringen.
2. Urin- oder Liquorproben sind ohne zusätzliche Verarbeitung testbereit. Besondere Konservierungsmittel sind nicht erforderlich.
3. Sollten im Urin oder Liquor Blutzellen oder Zellreste vorhanden sein, muss die Probe vor dem Test zentrifugiert werden.
4. Protein im Urin kann an einer 24-Stunden-Probenentnahme oder an einer Stichprobe bestimmt werden.
5. Urinproben können bei 2 bis 8 C bis zu 24 Stunden oder gefroren bis zu 3 Monate vor dem Test aufbewahrt werden. Liquorproben können bei 2 bis 8 C mehrere Tage oder gefroren mehrere Monate lang vor dem Test aufbewahrt werden.

Verfahren
Die Proteinkonzentration unbekannter Proben kann durch Feststellung der Probenextinktion auf einer Standardkurve und Ablesen der entsprechenden Proteinkonzentration oder durch Ein-Punkt-Kalibrierung bestimmt werden (siehe Berechnung der Ergebnisse unten).

Eine Standardkurve kann durch Aufzeichnen der Extinktion jedes Standards gegenüber der entsprechenden Proteinkonzentration in mg/dl erstellt werden.

Wird die Proteinkonzentration unbekannter Proben durch die Berechnungsmethode bestimmt, sollte der Standard verwendet werden, der der Konzentration der zu testenden Probe am ehesten entspricht; d. h., beim Testen normaler Liquorproben sollte der 50 mg/dl Standard und beim Testen normaler Urinproben der 25 mg/dl Standard verwendet werden. Wenn die Proteinkonzentration der Probe höher oder niedriger als diese Konzentrationen ist, sollte der Standard verwendet werden, der der Konzentration der zu testenden Probe am ehesten entspricht.

Der Proteingehalt kann entweder mit einer 20 µl oder 50 µl großen Probe gemessen werden. Die 50-µl-Probe ergibt einen Linearbereich bis zu 150 ml/dl Protein. Um den Linearitätsbereich der Testmethode auf 350 mg/dl zu erweitern, sollte eine 20-µL-Probengröße verwendet werden (siehe Abschnitt Einschränkungen unten).

Testverfahren
1. quanTtest red Reagenz, Standards, Kontrollen und Proben aus dem Kühlschrank nehmen und auf Raumtemperatur (18 bis 25 C) bringen.
2. Teströhrchen für jede Probe beschriften: Reagenzienleerwert, Standards, Kontrollen und

Die folgenden Symbole werden in Reagenzienpackungen für Quantimetrix Corporation verwendet.

CE-Konformitätskennzeichnung | LOT Bezeichnung | Hergestellt von | IVD In-vitro Diagnosticum | Biogefährdung | Cont. Inhalt der Packung | REF Bestellnr. | Siehe Packungsbeilage | EC REP Bevollmächtigter | Aufbewahrung bei | Verwendbar bis (letzter Tag des Monats)

für den Test vorgesehene Patientenproben.
3. 50 µL (20 µL) jeder Probe in das entsprechende Röhrchen pipettieren. Für den Reagenzienleerwert destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.
4. Exakt 2,5 ml Reagenz in jedes Röhrchen pipettieren. Den Röhrcheninhalt durch Vortexieren oder Schütteln gut mischen.
5. Vor dem Ablesen der Extinktion A_{600} die Reaktionsmischung mindestens 15 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Farbe der Reaktionsmischung ist bis zu 60 Minuten stabil.
6. Den Inhalt des Reagenzienleerwerts in eine saubere Küvette überführen und das Spektrophotometer bei 600 nm auf Null justieren.
   HINWEIS: Falls sich die Küvette in Schritt 6 einfärbt, wurde Farbstoff an das Glas adsorbiert und muss zur Vermeidung von verfälscht hohen Ergebnissen gereinigt werden. Nach der Reinigung gründlich mit destilliertem oder deionisiertem Wasser ausspülen und trocknen. Schritt 6 wiederholen.
7. Jede Probe gegen den Reagenzienleerwert lesen und die erhaltenen Extinktionswerte notieren.
8. Beim Erstellen einer Standardkurve muss die Extinktion jedes Standards gegenüber der entsprechenden Proteinkonzentration auf dem mitgelieferten Millimeterpapier verzeichnet werden. Dann eine gerade Ideallinie durch die Punkte ziehen. Die Proteinkonzentration unbekannter Proben durch Feststellung der Extinktionen auf der Standardkurve und Ablesen der entsprechenden Proteinkonzentration bestimmen. Zur Berechnung der Ergebnisse nach dem Beispiel im Abschnitt Berechnung der Ergebnisse vorgehen.

Verfahren mit Analyseautomaten
Das quanTtest red Gesamtprotein-Assaysystem kann genaue Ergebnisse liefern, wenn jede Reaktion in genau eingehaltenen 3-Minuten-Intervallen abgelesen wird; damit eignet sich das Verfahren für Analyseautomaten. Anweisungen zur Verwendung dieses Produkts sind den entsprechenden Anleitungen für das Pyrogallolrot-Verfahren jedes Gerätes zu entnehmen. Diese Anleitungen sind vom technischen Kundendienst von Quantimetrix oder vom Hersteller des jeweiligen Gerätes erhältlich.

Berechnung der Ergebnisse
Die Proteinkonzentrationen in Urin oder Liquor werden in mg/dl angegeben. Die Proteinkonzentration unbekannter Proben kann durch Feststellung der Probenextinktion auf der Standardkurve und Ablesen der entsprechenden Proteinkonzentration **ODER** durch die folgende Berechnung bestimmt werden:

Berechnung der Gesamtproteinkonzentration
Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen der Patientenproben die folgende Formel verwenden.

$$\textbf{Proteinkonzentration (mg/dl)} = \frac{\text{Extinktion der Probe}}{\text{Extinktion des Standards}} \times \textbf{Konzentration des Standards (mg/dl)}$$

Die folgenden Beispiele dienen nur zu Anschauungszwecken.

Liquor

Liquor-Patientenprobe A_{600}	= 0,200
50 mg/dL Standard A_{600}	= 0.310
(0,200 / 0,310) X 50 mg/dl	= 32,3 mg/dl

Urin

Urin-Patientenprobe A_{600}	= 0,120
25 mg/dL Standard A_{600}	= 0,165
(0,120 / 0,165) X 25 mg/dl	= 18,2 mg/dl

Berechnung der 24-Stunden-Urinproteinkonzentration
1. Das 24-Stunden-Urinvolumen abmessen (ml).
2. Dieses Volumen durch 100 teilen, um das Volumen in Dezilitern (dl) auszudrücken.
3. Das 24-Stunden-Urinvolumen in dl mit der Proteinkonzentration in mg/dl gemäß quanTtest red Verfahren multiplizieren.
4. Das Ergebnis ist die Proteinmenge in mg pro 24 Stunden.

Das folgende Beispiel dient nur zu Anschauungszwecken.

Patienten-Urinvolumen	= 1550 ml
Patienten-Urinproteinkonzentration	= 18,2 mg/dl
(1550 ml / 100 ml/dl) X 18,2 mg/dl	= 282,1 mg/24 Stunden

Qualitätskontrolle
Für alle klinischen Labore wird ein Qualitätskontrollprogramm empfohlen. Zur Überwachung der Verfahrensleistung wird die Analyse des Kontrollmaterials mit festgelegten Werten im normalen und abnormalen Bereich empfohlen. Die erhaltenen Werte der Kontrollen sollten im für das Labor akzeptablen Bereich liegen. Ein Qualitätskontrollprogramm, quantrol™, ist von Quantimetrix erhältlich. Weitere Informationen sind auf Anfrage erhältlich.

Einschränkungen
Die Linearität der Testmethode beträgt 150 mg/dl Gesamtprotein bei Verwendung einer 50 µl großen Probe. Die Linearität kann durch Verringerung des Probenvolumens auf 20 µl erweitert werden. Die Gesamtproteinkonzentration wird dann auf 350 mg/dl linear. Durch Verdünnung von Proben mit höheren Proteinkonzentrationen auf ungefähr 100 mg/dl mit destilliertem oder deionisiertem Wasser kann eine höhere Genauigkeit erreicht werden; dabei muss der Verdünnungsfaktor beim erneuten Testen und der Berechnung der Gesamtproteinkonzentration berücksichtigt werden.

Einige Tenside können die Färbung beeinträchtigen. Kationische Tenside ergeben im Allgemeinen die gleiche Färbung wie Protein. Da durch Anionen die Färbereaktion vermindert wird, muss die gesamte Ausrüstung mit destilliertem Wasser gründlich abgewaschen werden, bis keine Tensidreste mehr übrig sind. Vor der Verwendung die Ausrüstung gründlich trocknen.

Hämoglobin ergibt ungefähr die Hälfte der Färbereaktion von Albumin. Urinproben mit Blutgehalt (Hämaturie) ergeben einen fälschlich erhöhten Wert.

Kupfer- und Eisenionen können Messfehler verursachen. Es ist besonders darauf zu achten, Verschmutzungen der verwendeten Geräte zu vermeiden.

Das Reagenz enthält lichtempfindliche Komponenten. Vor Lichteinwirkung schützen.

Das quanTtest red System kann Protein mit geringem Molekulargewicht sowie Immunglobulin/L-Ketten (Bence-Jones-Proteine) zu niedrig bewerten.

Bei normalem Gebrauch werden Küvetten, Kulturröhrchen und Geräte selten eingefärbt. Werden jedoch viele Proben gleichzeitig verarbeitet oder liegt in einer Probe eine besonders hohe Proteinkonzentration vor, kann etwas Farbstoff zurückbleiben. In diesem Fall die Glasbehälter und Geräte gründlich reinigen.

Technische Updates sind auf unserer Website erhältlich.

Erwartete Werte
Normalwerte können je nach Patientenpopulation und Laborbedingungen unterschiedlich ausfallen. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich bestimmen. Bei Verwendung der Pyrogallolrot-Methode mit Proben von klinisch gesunden Patienten können Proteinwerte in Liquor zwischen 15 und 45 mg/dl und bei älteren Personen bis zu 60 mg/dl betragen. Urinausscheidung von Protein beträgt normalerweise weniger als 200 mg/24 Stunden bei Volumen von 1000 bis 1500 ml/24 Stunden. Normale Urin-Stichproben liegen bei 0 bis 20 mg/dl Protein.

Spezifische Leistungsmerkmale

Spezifität
Die Spezifität des quanTtest red Testverfahrens wurde durch Analyse von Urinproben nach Zugabe von möglichen Störsubstanzen ermittelt. Hämoglobin, Eisen- und Kupferionen haben sich als störend erwiesen. Die folgende Tabelle enthält eine Liste der störenden Substanzen.

Tabelle von Störsubstanzen

Zusatzstoff Name	Zugefügte Konz. (mg/dl)	Gemessene. Konz. des normalerweise (mg/dl)	Menge im Urin enthaltenen Gesamtproteins
Keine	—	29	—
Harnstoffstickstoff	2300	29	10,5 g/Tag
Harnsäure	300	30,5	250 - 750 mg/Tag
Kreatinin	300	28,5	Männer 1000 - 1700 mg/Tag Frauen 1175 - 1468 mg/Tag
Ammoniak	250	30	0,41 - 0,82 g/Tag
Glucose	5,000	28	30 - 130 mg/Tag
Ascorbinsäure	200	28,5	0,1 - 0,4 mg/kg/Tag
Glutathion	50	29	—
Zitronensäure	200	29,5	0,3 - 0,9 mg/Tag
Oxalsäure	100	26	15 - 30 mg/Tag
Weinsäure	200	28	—
Na	600	30	6 - 8,4 g/Tag
K	250	28	1,8 - 2 g/Tag
Cl	1,000	30	11,1 - 18,2 g/Tag
Ca	100	30	240 - 320 mg/Tag
Mg	30	29	70 - 155 mg/Tag
P	200	33	—
Cu	10	39	250 µg/Tag
Fe^{2+}	10	36,5	60 - 100 µg/Tag
Bilirubin	20	30,5	3,08 ± 0,28 mg/Tag

Präzision
Die Präzision des quanTtest red Systems wurde durch Analyse einer Reihe von Quantimetrix Urin- und Liquor-Kontrollen ermittelt. Der Assay wurde mit Quantimetrix-Standards, die auch in diesem Kit enthalten sind, kalibriert. Die Reaktion wurde nach 3 Minuten und nach 15 Minuten auf einem Gilford Stasar II Spektrophotometer abgelesen.

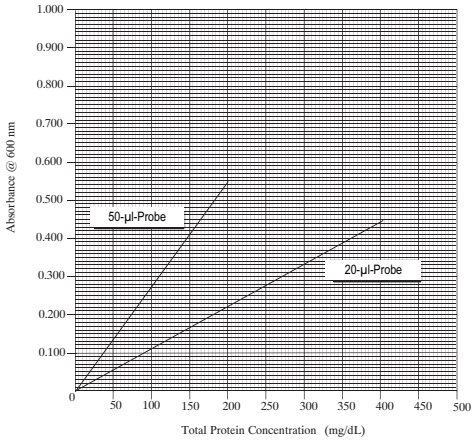
Bei Ablesen nach 3 Minuten:

	Innerhalb eines Durchlaufs (n=10)			Zwischen verschiedenen Durchläufen (n=18)		
	Mittelwert (mg/dl)	SA	%CV	Mittelwert (mg/dl)	SA	%CV
Urin Level 1	15,3	2,3	14,9	14,9	1,3	8,7
Urin Level 2	62,5	2,5	4,0	61,8	2,5	4,1
Liquor Level 1	36,3	2,9	7,9	35,3	3,3	9,4
Liquor Level 2	66,7	2,1	3,2	65,2	3,3	5,1

Bei Ablesen nach 15 Minuten:

	Innerhalb eines Durchlaufs (n=10)			Zwischen verschiedenen Durchläufen (n=18)		
	Mittelwert (mg/dl)	SA	%CV	Mittelwert (mg/dl)	SA	%CV
Urin Level 1	15,2	0,4	2,6	15,5	1,3	7,5
Urin Level 2	63,3	3,0	4,8	62,8	1,9	3,1
Liquor Level 1	36,7	2,6	7,2	35,9	3,4	9,5
Liquor Level 2	69,6	2,6	3,7	68,0	2,6	3,9

Beispielgraph



Korrelation
Vergleich der quanTtest red Methode mit einer Coomassie-Blue-Methode (Quantimetrix) zur Proteinbestimmung ergibt beim Testen von 29 Patientenproben die folgende Korrelation.

n=29	Mittelwert	Korrelations- koeffizient (r)	Neigung	Intercept
Coomassie Blue	43,04	0,9923	1,05	–0,18
quanTtest red	45,20			

Bibliographie

1. Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. CV Mosby Co, 1987.
2. Fujita Y, Mori I, Kitano S. Bunseki Kagaku 1983;32:379.
3. Lievens MM, Celis PJ. Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine. Clin Chem 1982;28:2328.
4. Muir A, Hensley WJ. Pseudoproteinuria due to penicillins in the turbidimetric measurement of proteins with trichloroacetic acid. Clin Chem 1979;25:1662-1663.
5. Young GS et al. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1975;21:1D.
6. Martin EW. Hazard of Medication (Alexander SF, Farage, DJ, Hassan WE Jr. eds.) Philadelphia PA and Toronto Canada: JB Lippincott Co 1971:169-189.
7. Constantino NV, Kabat HF. Drug-induced modification for laboratory test values, revised 1973. Am J Hosp Pharm 1973;30:24.
8. Watanabe N, Makino K, Kamei S, Okubo A, Yamanaka M, Osawa S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
9. Yoshizaki H, Osawa S, Furuya S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 1976;72:248.
11. Kingsbury FB, Clark CP, Williams G, Post AL. J Lab Clin Med 1926;11:981.
12. Meulemans O. Clin Chem, Acta 1960;5:757.
13. Saito M, Kitamura M, Niwa M. Rinsho-kagaku-bunseki II. Tokyo Kagakudojin 1979:21.

QuanTtest Red Total Protein Assay System — Pyrogallol Red

LOT 21220 | REF 5210-12 | IVD | 2013-12 | CE

Utilisation prévue
Le kit de dosage des protéines totales quanTtest red est conçu pour la détermination quantitative des protéines dans le liquide céphalorachidien (LCR) et l'urine pour les kits manuels et automatisés.

Résumé et explication
La détermination des protéines totales dans l'urine et le liquide céphalorachidien permet le diagnostic des troubles rénaux et du système nerveux central, respectivement. Une hausse des taux de protéines dans l'urine est souvent détectée dans les cas suivants : activité physique intense, fièvre et hypothermie, gammapathies monoclonales, néphrite, néphrose et néphropathie diabétique, et infections des voies urinaires. La détermination des protéines totales dans le liquide céphalorachidien permet le diagnostic des pathologies suivantes : méningite, encéphalite, poliomyélite, neurosyphilis, tumeurs du SNC et hémorragie cérébrale.[1]

Le kit de dosage des protéines totales quanTtest red offre une méthode simple de quantification des protéines utilisant des échantillons de quelques microlitres d'urine ou de LCR. Les protéines totales sont mesurées par la méthode de liaison du colorant à l'aide d'un complexe rouge de pyrogallol-acide molybdique (Mo^{+6}) décrite par Fujita et al.[2] À un pH faible, le colorant est rouge et vire au bleu lorsqu'il forme un complexe avec les protéines.

En fonction de l'équipement et de la taille de l'échantillon, une réponse linéaire est obtenue jusqu'à 350 mg/dl. La méthode de liaison au colorant rouge de pyrogallol peut être lue au bout de trois minutes, ce qui fait que le test peut être utilisé sur des instruments automatiques. La sensibilité de la méthode employant le rouge de pyrogallol permet d'utiliser le test avec des fluides corporels tels l'urine et le LCR dont les concentrations en protéines trop faibles pour être mesurées avec précision par d'autres méthodes de dosage des protéines.

La méthode du biuret n'est pas assez sensible pour permettre une détermination de la protéinurie. Les résultats des méthodes turbidimétriques peuvent varier en fonction du type et de la concentration du précipitant, du type de protéine, de la température et du délai écoulé avant lecture. Certains médicament interfèrent avec les méthodes turbidimétriques.[3,4] La méthode quanTtest red présente une plus grande plage de linéarité que la méthode utilisant le bleu de Coomassie.

La globuline et l'albumine peuvent être mesurées à l'aide du réactif quanTtest red. Les surfactants, les ions cuivre ou fer interfèrent avec les résultats. Les échantillons présentant une hématurie génèrent des valeurs faussement élevées. Cette méthode réduit la coloration en cuvette et peut être adaptée aux analyseurs automatiques.

Principe de la procédure
Le dosage repose sur l'interaction des protéines avec le complexe rouge de pyrogallol-molybdène. Le rouge de pyrogallol s'associe à l'acide molybdique dans le réactif pour former un complexe rouge dont l'absorbance maximale se situe à 470 nm. Lorsque toutes les conditions sont réunies, en présence de protéines, une coloration bleu-violet se forme et l'absorption maximale du colorant passe de 470 nm à 604 nm. La concentration en protéines totales de l'échantillon peut être mesurée en lisant l'absorbance à 600 nm. La réponse de coloration est linéaire et permet des déterminations précises du taux de protéines.

Réactifs
1. Le réactif quanTtest red est fourni sous forme de liquide prêt à l'emploi dans des flacons de 250 ml, contenant du rouge de pyrogallol (0,020 g/l), du sodium molybdate (0,06 g/l), de l'acide succinique (4,8 g/l), du sodium benzoate (0,4 g/l), de l'oxalate de sodium (0,25 g/l), du méthanol à 12 ml/l et un surfactant.
2. **Kit de solution protéinique étalonnée** en flacons compte-gouttes de 30 ml, à quatre concentrations protéiniques de 25, 50, 100 et 200 mg/dl, sous forme de solution aqueuse à 70 % d'albumine sérique humaine et 30 % de globuline sérique humaine dans une solution saline tamponnée de borate. (Voir la notice des étalons de protéine humaine fournie). De l'azide de sodium a été ajouté comme conservateur.
3. **Contrôles liquides de LCR**, niveaux 1 et 2, fournis 3 ml par flacon. (Voir la notice du contrôle de LCR également fourni). De l'azide de sodium a été ajouté comme conservateur.
4. **Contrôles liquides d'urine humaine**, niveaux 1 et 2, fournis 10 ml par flacon. (Voir la notice du contrôle d'urine fournie). De l'azide de sodium a été ajouté comme conservateur.
5. **Papier millimétré**
6. **Mode d'emploi** (produits concernés répertoriés ci-après)

Produit	Réf. n°	Contenu
Réactif quanTtest red	5210-12	1 x 250 ml
quanTtest red	2210-02	200 kits
Réactif		2 x 250 ml
Étalons 25, 50, 100, 200 mg/dl		1 x 30 ml chacun
Contrôle de LCR niveaux 1 et 2		1 x 3 ml chacun
Contrôle d'urine niveaux 1 et 2		1 x 10 ml chacun

Matériels requis mais non fournis
1. Pipettes de 20 µl ou 50 µl, et 2,5 ml.
2. Tubes à essai : il est recommandé d'utiliser des tubes de culture de 13 x 100 mm.
3. Spectrophotomètre pouvant lire l'absorbance à 600 nm.
4. Cuvette : verre ou plastique jetable.
5. Eau distillée ou déionisée.

Instrument
Le kit de dosage des protéines totales quanTtest red requiert l'utilisation d'un spectrophotomètre manuel ou automatique pouvant mesurer l'absorbance à 600 nm. Consulter le manuel du fabricant pour des instructions spécifiques sur le fonctionnement et l'utilisation de l'instrument. Les applications de l'analyseur automatique sont disponibles sur demande auprès du Service technique de Quantimetrix.

Pour utilisation diagnostique *in vitro* uniquement

Avertissements et précautions
Le réactif quanTtest red est formulé avec du méthanol acide. Ne pas avaler. Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement à grande eau et consulter un médecin. Laver la peau à l'eau savonneuse. Ne pas pipeter à la bouche.

Les étalons et les contrôles sont formulés à partir de produits d'origine humaine. Toutes les unités de donneurs de sang utilisées dans le matériel d'origine sérique ont été testées en utilisant des méthodes approuvées par la FDA. Elles se sont révélées non réactives à l'antigène de surface de l'hépatite B, ainsi qu'aux anticorps de l'hépatite C et du VIH. **MATÉRIEL PRÉSENTANT UN RISQUE BIOLOGIQUE**. Aucun test connu n'est en mesure de garantir qu'un produit dérivé de sang humain ne contient pas le virus de l'hépatite ou le VIH. Lors de la manipulation de ces échantillons, il est vivement conseillé de suivre les recommandations de biosécurité de niveau 2 énoncées par les Centers for Disease Control.

Eliminer les déchets conformément au règlement en vigueur.

Reconstitution des réactifs
Réactif
Le réactif quanTtest red ne nécessite aucune reconstitution ni dilution. Sortir le réactif du réfrigérateur et préparer suffisamment d'aliquotes pour le nombre de tests à effectuer. Laisser l'aliquote atteindre la température ambiante (18 - 25 C) avant utilisation.

Étalons et contrôles
Sortir les étalons et les contrôles du réfrigérateur et patienter environ 30 minutes pour qu'ils soient à température ambiante (18 à 25 C) avant de les utiliser. Les étalons et les contrôles ne nécessitent aucune reconstitution. Retourner doucement les flacons pour assurer l'homogénéité de leur contenu. Éviter de faire mousser.

Conservation et stabilité
Réactif
1. Conserver le réactif quanTtest red entre 2 et 8 C et bien fermé. Conserver à l'abri de la lumière.
2. Lorsqu'il est conservé correctement, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption figurant sur chaque étiquette de réactif.
3. Jeter tout réactif présentant un signe de précipitation ou de turbidité.

Étalons et contrôles
1. Conserver les étalons et les contrôles entre 2 et 8 C.
2. Lorsqu'ils sont conservés entre 2 et 8 C entre deux utilisations, les étalons et les contrôles sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Ne pas utiliser les étalons et les contrôles après la date de péremption figurant sur chaque étiquette.
3. Tout étalon ou contrôle présentant des traces de turbidité ou de contamination microbienne doit être jeté.

Manipulation des échantillons
1. Sortir les échantillons à tester du réfrigérateur et attendre qu'ils soient à température ambiante (18 à 25 C) avant de les analyser.
2. Les échantillons d'urine ou de LCR peuvent être utilisés sans autre préparation. Aucun conservateur particulier n'est nécessaire.
3. Si l'échantillon d'urine ou de LCR comporte des globules rouges ou des débris cellulaires, centrifuger l'échantillon avant de l'analyser.
4. La protéinurie peut être déterminée sur des échantillons prélevés sur 24 heures ou sur un échantillon aléatoire.
5. Les échantillons d'urine peuvent être conservés entre 2 et 8 C pendant 24 heures maximum ou congelés pendant 3 mois jusqu'à ce qu'ils soient analysés. Les échantillons de LCR peuvent être conservés entre 2 et 8 C pendant plusieurs jours ou congelés pendant plusieurs mois jusqu'à ce qu'ils soient analysés.

Procédure
La concentration en protéines d'échantillons inconnus peut être déterminée en établissant l'absorbance d'un échantillon sur une courbe étalon et en lisant la concentration correspondante; elle peut aussi être calculée par une procédure d'étalonnage à un point (voir Calcul des résultats ci-après).

Pour préparer la courbe étalon, noter l'absorbance obtenue pour chaque étalon et la concentration en protéines correspondante, en mg/dl.

Si la méthode de calcul est utilisée pour déterminer la concentration en protéines dans des échantillons inconnus, utiliser l'étalon qui correspond à peu près à la concentration de l'échantillon testé; ex: lorsque de l'analyse d'échantillons normaux de LCR, mesurer l'étalon 50 mg/dl et pour des échantillons d'urine normaux, l'étalon 25 mg/dl. Si la concentration en protéines de l'échantillon est supérieure ou inférieure à ces concentrations, utiliser l'étalon qui s'en rapproche le plus.

Les protéines peuvent être mesurée dans des échantillons de 20 ou de 50 µl. Un échantillon de 50 µl donne une plage linéaire allant jusqu'à 150 mg/dl de protéines. Pour étendre la plage de linéarité de la méthode de test à 350 mg/dl de protéines, utiliser un échantillon de 20 µl (voir le point Limites ci-après).

Procédure de test
1. Laisser les réactifs, étalons et contrôles quanTtest red ainsi que les échantillons atteindre la température ambiante (18 - 25 C).
2. Étiqueter les tubes à essai pour chaque échantillon : réactif, étalons, contrôles et échantillons de patient à tester.

Les symboles suivants sont utilisés dans les coffrets de réactifs de Quantimetrix Corporation.

CE Conformité aux normes européennes | LOT Désignation du lot | Fabriqué par | IVD Pour diagnostic in vitro | Risque biologique | Cont. Contenu du coffret | REF N° de catalogue | Voir notice d'utilisation | EC REP Représentant agréé | Conservation à | Utilisable jusqu'à (dernier jour du mois indiqué)

Quantimetrix 2005 Manhattan Beach Blvd. Redondo Beach CA 90278-1205 USA • +1.310.536.0006 FAX +1.310.536.9977 • www.4qc.com • **MO21022A-12/10**

3. Pipeter 50 µl (20 µl) de chaque échantillon dans le tube adéquat. Utiliser de l'eau distillée ou déionisée pour le tube du réactif.
4. Pipeter exactement 2,5 ml de réactif dans chaque tube. Mélanger au vortex ou en agitant les tubes.
5. Laisser le mélange reposer à température ambiante pendant au moins 15 minutes avant de lire la valeur A_{600}. La couleur du mélange est stable pendant 60 minutes maximum.
6. Transférer le réactif dans une cuvette propre et régler le spectrophotomètre pour lire le zéro à 600 nm.
   REMARQUE: Si la cuvette se colore à l'étape 6, le colorant a été adsorbé sur le verre et doit être nettoyé sous peine d'obtenir des résultats faussement élevés. Après nettoyage, rincer abondamment à l'eau distillée ou déionisée et sécher. Répéter l'étape 6.
7. Lire chaque échantillon par rapport au réactif et noter les valeurs d'absorbance obtenues.
8. En cas de préparation d'une courbe étalon, noter l'absorbance de chaque étalon et la concentration en protéines correspondante sur le papier millimétré fourni. Tracer la droite reliant le maximum de points possible. Déterminer la concentration en protéines de l'échantillon inconnu de patient en repérant l'absorbance sur la courbe étalon et en lisant la concentration en protéines correspondante. En calculant les résultats, suivre l'exemple donné au point Calcul des résultats ci-après.

Méthodes utilisant des instruments automatiques
L'efficacité du kit de dosage des protéines totales quanTtest red a été évaluée lorsque chaque réaction est lue à des intervalles précis de 3 minutes, ce qui rend la méthode adaptée à une utilisation sur des instruments automatiques. Consulter les applications spécifiques à l'instrument pour la méthode au rouge de pyrogallol afin de savoir comment utiliser ce produit. Contacter le Service technique de Quantimetrix ou le fabricant de l'instrument pour connaître ces applications.

Calcul des résultats
Les concentrations en protéines dans l'urine ou le LCR sont exprimées en mg/dl. La concentration en protéines des échantillons inconnus peut être déterminée en établissant l'absorbance d'un échantillon sur une courbe étalon et en lisant la concentration correspondante **OU** peut être calculée comme suit :

Calcul des protéines totales
Utiliser la formule suivante pour calculer les concentrations en protéines des échantillons de patient.

$$\text{Concentration en protéines (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance de l'échantillon}}{\text{absorbance de l'étalon}} \times \text{concentration de l'étalon. (mg/dl)}$$

Les chiffres suivants sont donnés à titre d'exemple uniquement.

Liquide céphalorachidien

Échantillon de LCR du patient A_{600}	= 0,200
50 mg/dl Étalon A_{600}	= 0,310
(0,200 / 0,310) X 50 mg/dl	= 32,3 mg/dl

Urine

Échantillon d'urine du patient A_{600}	= 0,120
25 mg/dl Étalon A_{600}	= 0,165
(0,120 / 0,165) X 25 mg/dl	= 18,2 mg/dl

Calcul de la protéinurie sur 24 heures
1. Mesurer le volume d'urine sur 24 heures (ml).
2. Diviser ce volume par 100 pour obtenir la mesure en décilitres (dl).
3. Multiplier le volume sur 24 heures en dl par la concentration en protéines en mg/dl déterminée par la procédure quanTtest red.
4. Le chiffre ainsi obtenu correspond à la quantité de protéines en mg par 24 heures.

Les chiffres suivants sont donnés à titre d'exemple uniquement.

Volume d'urine du patient	= 1,550 ml
Protéinurie du patient	= 18,2 mg/dl
(1550 ml / 100 ml/dl) X 18,2 mg/dl	= 282,1 mg/24 heures

Contrôle qualité
Un programme de contrôlé qualité est recommandé dans tous les laboratoires cliniques. L'analyse du matériel de contrôle avec les valeurs obtenues dans les plages normales et anormales est recommandée pour surveiller les performances de la procédure. Les valeurs obtenues pour les contrôles doivent s'inscrire dans la plage acceptable du laboratoire. Quantimetrix met à la disposition des utilisateurs un programme de contrôle qualité appelé quantrol™. Demander tous les renseignements à ce sujet.

Limites
La linéarité de la méthode de test est établie jusqu'à 150 mg/dl de protéines totales sur un échantillon de 50 µl. Elle peut être étendue en réduisant la quantité d'échantillon à 20 µl. La concentration en protéines totales devient alors linéaire jusqu'à 350 mg/dl. La précision peut être accrue en diluant les échantillons dont la concentration en protéines est plus élevée à environ 100 mg/dl dans de l'eau distillée ou déionisée, en recommençant le dosage et en corrigeant le résultat en fonction du facteur de dilution pour le calcul de la concentration en protéines totales.

Certains types d'agents de surface tensioactifs peuvent affecter la couleur. En général, les surfactants cationiques donnent la même couleur que les protéines. Étant donné que les anions inhibent la réaction de coloration, il convient de laver avec soin l'équipement, en utilisant de l'eau distillée, jusqu'à élimination totale des agents de surface. Bien sécher l'équipement avant utilisation. L'hémoglobine génère environ la moitié de la réaction de coloration qu'entraîne l'albumine. Les échantillons présentant une hématurie donne un résultat faussement élevé.

Les ions cuivre et fer peuvent provoquer des erreurs de mesure. Il convient de prendre toutes les précautions pour éviter la contamination de l'appareil.

Le réactif contient des composants sensibles à la lumière. Conserver à l'abri de la lumière.

Le kit quanTtest red peut sous-estimer les protéines de faible poids moléculaire et les chaînes légères d'immunoglobuline (protéines de Bence Jones).

Lors des procédures de routine, les cuvettes, les tubes de culture et l'équipement sont rarement colorés. Cependant, lorsque plusieurs échantillons sont analysés en même temps ou si un échantillon contient une concentration élevée en protéines, une partie du colorant peut se déposer. Dans ce cas, nettoyer avec soin le matériel et la verrerie.

Les mises à jour techniques sont disponibles sur notre site Web.

Valeurs attendues
Les plages normales peuvent varier en fonction de la population de patients et des conditions d'analyse. Il incombe à chaque laboratoire de déterminer sa propre plage normale. Lorsque la méthode utilisant le rouge de pyrogallol est employée sur des échantillons prélevés chez des sujets sains, les niveaux de protéines dans le LCR doivent être compris entre 15 et 45 mg/dl et jusqu'à 60 mg/dl chez des personnes âgées. L'excrétion urinaire des protéines est généralement inférieure à 200 mg/24 heures dans un volume compris entre 1000 et 1500 ml/24 heures. Les échantillons d'urine normaux contiennent entre 0 et 20 mg/dl de protéines.

Caractéristiques de performance spécifiques

Spécificité
La spécificité de la méthode quanTtest red a été déterminée par analyse d'échantillons d'urine après ajout de substances potentiellement interférentes. Il s'est avéré que l'hémoglobine, les ions fer et cuivre provoquent des interférences. Voir le tableau des substances interférentes ci-après.

Tableau des substances interférentes

Additif Nom	Conc. ajoutée (mg/dl)	Conc. mesurée de protéines totales (mg/dl)	Quantité normalement présentes dans l'urinee
Aucun	—	29	—
Nitrogène d'urée	2,300	29	10,5 g/jour
Acide urique	300	30,5	250-750 mg/jour
Créatinine	300	28,5	homme 1000-1700 mg/jour femme 1175-1468 mg/jour
Ammoniaque	250	30	0,41-0,82 g/jour
Glucose	5,000	28	30-130 mg/jour
Acide ascorbique	200	28,5	0,1-0,4 mg/kg/jour
Glutathion	50	29	—
Acide citrique	200	29,5	0,3-0,9 mg/jour
Acide oxalique	100	26	15-30 mg/jour
Acide tartrique	200	28	—
Na	600	30	6-8,4 g/jour
K	250	28	1,8–2 g/jour
Cl	1000	30	11,1-18.2 g/jour
Ca	100	30	240–320 mg/jour
Mg	30	29	70-155 mg/jour
P	200	33	—
Cu	10	39	250 µg/jour
Fe^{2+}	10	36,5	60-100 µg/jour
Bilirubine	20	30,5	3,08 ± 0,28 mg/jour

Précision
La précision du kit quanTtest red a été établie en analysant une série de contrôles de LCR et d'urine Quantimetrix. Le dosage a été étalonné à l'aide des étalons Quantimetrix inclus dans le kit. La réaction a été lue à 3 minutes et à 15 minutes sur un spectrophotomètre Gilford Stasar II.

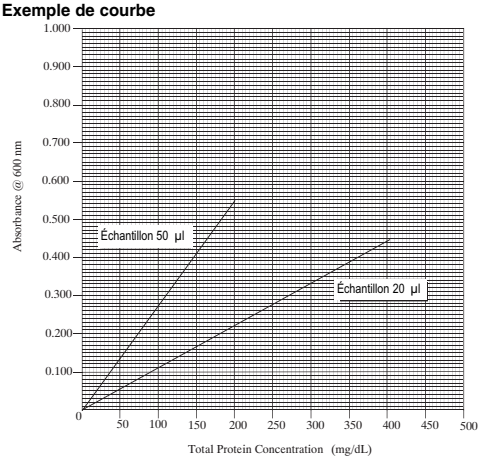
Lecture à 3 minutes:

	Intracycle (n=10)			Inter-cycles (n=18)		
	Moyenne (mg/dl)	ET	% CV	Moyenne (mg/dl)	ET	% CV
Urine niveau 1	15,3	2,3	14,9	14,9	1,3	8.7
Urine niveau 2	62,5	2,5	4,0	61,8	2,5	4,1
LCR niveau 1	36,3	2,9	7,9	35,3	3,3	9,4
LCR niveau 2	66,7	2,1	3,2	65,2	3,3	5,1

Lecture à 15 minutes:

	Intracycle (n=10)			Inter-cycles (n=18)		
	Moyenne (mg/dl)	ET	% CV	Moyenne (mg/dl)	ET	% CV
Urine niveau 1	15,2	0,4	2,6	15,5	1,3	7,5
Urine niveau 2	63,3	3,0	4,8	62,8	1,9	3,1
LCR niveau 1	36,7	2,6	7,2	35,9	3,4	9,5
LCR niveau 2	69,6	2,6	3,7	68,0	2,6	3,9

Exemple de courbe



Corrélation
La comparaison d'une méthode quanTtest red avec une méthode utilisant le bleu de Coomassie (Quantimetrix) pour la détermination protéinique donne les valeurs de corrélation suivantes sur 29 échantillons d'urine de patients.

n=29	Moyenne	Coefficient de corrélation (r)	Pente	Intercept
Bleu de Coomassie	43,04	0,9923	1,05	-0,18
quanTtest red	45,20			

Références

1. Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. CV Mosby Co, 1987.
2. Fujita Y, Mori I, Kitano S. Bunseki Kagaku 1983;32:379.
3. Lievens MM, Celis PJ. Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine. Clin Chem 1982;28:2328.
4. Muir A, Hensley WJ. Pseudoproteinuria due to penicillins in the turbidimetric measurement of proteins with trichloroacetic acid. Clin Chem 1979;25:1662-1663.
5. Young GS et al. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1975;21:1D.
6. Martin EW. Hazard of Medication (Alexander SF, Farage, DJ, Hassan WE Jr. eds.) Philadelphia PA and Toronto Canada: JB Lippincott Co 1971:169-189.
7. Constantino NV, Kabat HF. Drug-induced modification for laboratory test values, revised 1973. Am J Hosp Pharm 1973;30:24.
8. Watanabe N, Makino K, Kamei S, Okubo A, Yamanaka M, Osawa S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
9. Yoshizaki H, Osawa S, Furuya S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 1976;72:248.
11. Kingsbury FB, Clark CP, Williams G, Post AL. J Lab Clin Med 1926;11:981.
12. Meulemans O. Clin Chem, Acta 1960;5:757.
13. Saito M, Kitamura M, Niwa M. Rinsho-kagaku-bunseki II. Tokyo Kagakudojin 1979:21.

QuanTtest Red Total Protein Assay System — Pyrogallol Red

LOT 21220 | REF 5210-12 | IVD | 2013-12 | CE

Finalità d'uso
Il sistema di analisi della proteina totale quanTtest red è previsto per la determinazione quantitativa della proteina nel fluido cerebrospinale e nell'urina per sistemi sia manuali che automatici.

Sommario e spiegazione
La determinazione della proteina totale nell'urina e nel fluido cerebrospinale è utile nella diagnosi di malattie renali e del sistema nervoso centrale, rispettivamente. Valori elevati della proteina nell'urina si osservano comunemente nelle seguenti condizioni: esercizio fisico intenso, febbre e ipotermia, gammopatie monoclonali, nefrite, nefrosi e nefropatia diabetica e infezioni del tratto urinario. La determinazione della proteina totale nel fluido cerebrospinale è di ausilio nella diagnosi di condizioni quali: meningite, encefalite, poliomielite, neurosifilide, tumori dell'SNC ed emorragia cerebrale.[1]

Il sistema di analisi della proteina totale quanTtest red offre un metodo semplice per la quantificazione della proteina usando campioni di urina o fluido cerebrospinale nell'ordine dei microlitri. La proteina totale viene misurata con il metodo colorimetrico usando un complesso di rosso pirogallollo e acido molibdico (Mo^{+6}) descritto da Fujita et al[2]. A un pH basso il colorante è rosso e diventa blu quando il complesso interagisce con la proteina.

A seconda dell'apparecchiatura e della quantità di campione utilizzati, si ottiene una risposta di 350 mg/dl. Il metodo colorimetrico con rosso pirogallollo può essere letto dopo tre minuti rendendo il test idoneo per gli strumenti automatici. La sensibilità del metodo con rosso pirogallollo rende il test adatto all'uso con fluidi corporei come il fluido cerebrospinale e l'urina, che contengono concentrazioni proteiche troppo basse per la misurazione precisa con altri metodi di quantificazione della proteina.

Il metodo biuret non è sufficientemente sensibile per la determinazione della proteinuria. I risultati con i metodi turbidimetrici possono variare a seconda del tipo e della concentrazione del precipitante, del tipo di proteina, della temperatura e del tempo trascorso prima della lettura. È stato dimostrato che alcune sostanze interferiscono con i metodi turbidimetrici.[3,4] Il metodo quanTtest red presenta un range di linearità superiore rispetto al metodo con blu Coomassie.

La globulina, come anche l'albumina, può essere misurata con il reagente quanTtest red. I surfattanti e gli ioni di rame o di ferro interferiscono con i risultati del test. I campioni che manifestano ematuria daranno risultati elevati falsi. Questo metodo riduce la colorazione delle cuvette e può essere adattato agli analizzatori automatici.

Principio della procedura
L'analisi si basa sull'interazione della proteina con il complesso rosso pirogallolo-molibdato. Il rosso pirogallollo si combina con l'acido molibdico nel reagente e forma un complesso rosso con un'assorbanza massima di 470 nm. Nelle condizioni del test, in presenza della proteina, si forma un colore blu-viola e l'assorbimento massimo del colorante cambia da 470 nm a 604 nm. La concentrazione della proteina totale nel campione può essere misurata leggendo l'assorbanza del campione a 600 nm. La risposta del colore è lineare e permette determinazioni accurate della proteina.

Reagenti
1. **Il reagente** quanTtest red è disponibile in forma liquida pronto per l'uso, in flaconi da 250 ml contenenti rosso pirogallolo (0,020 g/l), molibdato di sodio (0,06 g/l), acido succinico (4,8 g/l), sodio benzoato (0,4 g/l), sodio ossalato (0,25 g/l), metanolo (12 ml/l) e surfattante.
2. **Il set di soluzione standard di proteina** confezionato in flaconi contagocce da 30 ml è disponibile in quattro concentrazioni di proteina: 25, 50, 100 e 200 mg/dl, sotto forma di soluzione acquosa costituita da albumina di siero umano al 70% e da globulina di siero umano al 30% in soluzione fisiologica tamponata con borati. Consultare il foglio illustrativo degli Standard della proteina umana fornito nella confezione. È stata aggiunta sodio azide come conservante.
3. **Controlli del fluido spinale**, Livelli 1 e 2, forniti 3 ml per flacone. Consultare il foglio illustrativo degli Standard della proteina umana fornito nella confezione. È stata aggiunta sodio azide come conservante.
4. **Controlli dell'urina umana**, Livelli 1 e 2, forniti 10 ml per flacone. Consultare il foglietto illustrativo del Controllo dell'urina fornito nella confezione. È stata aggiunta sodio azide come conservante.
5. **Carta millimetrata per impieghi grafici**
6. **Foglio con le istruzioni** (prodotti pertinenti riportati qui sotto)

Prodotto	Catalogo N.	Contenuto
Reagente quanTtest red	5210-12	1 x 250 ml
quanTtest red Sistema della proteina totale	2210-02	200 test
Reagente		2 x 250 ml
Standard 25, 50, 100, 200 mg/dl		1 x 30 ml cad.
Controllo del fluido spinale Livello 1 e 2		1 x 3 ml cad.
Controllo dell'urina Livello 1 e 2		1 x 10 ml cad.

Materiali necessari ma non forniti
1. Pipette in grado di erogare 20 µl o 50 µl e 2,5 ml.
2. Provette per reazione: si raccomandano 13 provette per coltura da 100 mm.
3. Spettrofotometro in grado di leggere l'assorbanza a 600 nm.
4. Cuvetta: di vetro o plastica monouso.
5. Acqua distillata o deionizzata.

Strumentazione
Il sistema di analisi della proteina totale quanTtest red richiede l'utilizzo di uno spettrofotometro manuale o automatico in grado di misurare l'assorbanza a 600 nm. Fare riferimento al manuale del produttore dello strumento per istruzioni specifiche relative al funzionamento e all'uso. Applicazioni per analizzatori automatici possono essere fornite su richiesta dal dipartimento di assistenza tecnica di Quantimetrix.

Solo per uso diagnostico *In Vitro*

Avvertenze e pracauzioni
Il reagente quanTtest red è formulato con metanolo acido. Non ingerire. Evitare il contatto con gli occhi, la cute e gli indumenti. In caso di contatto, sciacquare immediatamente con acqua abbondante e rivolgersi a un medico. Lavare la cute con acqua e sapone. Non pipettare con la bocca.

Gli standard e i controlli sono formulati da materiale di origine umana. Tutte le unità di donatori di sangue, compreso il materiale di origine del siero, sono state analizzate mediante metodi approvati dalla FDA e sono risultate non reattive per l'HCV, per l'antigene di superficie del virus dell'epatite B e per l'anticorpo anti-HIV. **MATERIALE POTENZIALMENTE FONTE DI RISCHIO BIOLOGICO**. Nessun metodo di analisi noto può garantire che un prodotto derivato da sangue umano non contenga il virus dell'epatite o dell'HIV. Si raccomanda che tali campioni siano trattati in conformità al Livello di sicurezza biologica 2 previsto dai Centers for Disease Control.

Eliminare eventuali materiali residui nel rispetto delle norme locali sullo smaltimento dei rifiuti.

Ricostituzione dei reagenti
Reagente
Il reagente quanTtest red non necessita di ricostituzione o diluizione. Rimuovere il reagente dal frigorifero e aliquotare una quantità sufficiente di reagente per il numero di test da eseguire. Attendere che l'aliquota raggiunga la temperatura ambiente (18 - 25 C) prima dell'uso.

Standard e controlli
Rimuovere gli standard e i controlli dal frigorifero e, prima di usarli, attendere circa 30 minuti che raggiungano la temperatura ambiente (18 - 25 C). Gli standard e i controlli non necessitano di ricostituzione. Capovolgere delicatamente gli standard e i controlli per garantire l'omogeneità del contenuto. Evitare la formazione di schiuma.

Conservazione e stabilità
Reagente
1. Conservare il reagente quanTtest red a 2 - 8 C sigillato. Proteggerlo dalla luce.
2. Se conservato correttamente il reagente è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non usare il reagente dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del contenitore di ogni reagente.
3. Eliminare il reagente se si notano segni di precipitazione o torbidità.

Standard e controlli
1. Gli standard e i controlli devono essere conservati a 2 - 8 C.
2. Se conservati a 2 - 8 C tra un utilizzo e l'altro, gli standard e i controlli sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Non usare gli standard e i controlli dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
3. Eliminare gli standard o i controlli se torbidi o se vi sono segni di contaminazione microbica.

Trattamento dei campioni
1. Rimuovere dal frigorifero i campioni da analizzare e attendere che raggiungano la temperatura ambiente (18 - 25 C) prima di analizzarli.
2. I campioni di urina o di fluido cerebrospinale possono essere usati senza ulteriore preparazione. Non sono necessari conservanti speciali.
3. Qualora nel campione di urina o fluido spinale dovessero essere presenti cellule ematiche o detriti cellulari, centrifugare il campione prima dell'analisi.
4. La proteinuria può essere determinata su un campione prelevato nel corso delle 24 ore o su un campione casuale.
5. I campioni di urina possono essere conservati a 2 - 8 C per un massimo di 24 ore o congelati per 3 mesi fino al momento dell'analisi. I campioni di FCS possono essere conservati a 2 - 8 C per diversi giorni o congelati per mesi fino al momento dell'analisi.

Procedura
La concentrazione proteica di campioni sconosciuti può essere determinata individuando l'assorbanza del campione su una curva standard e leggendo la corrispondente concentrazione proteica, oppure può essere calcolata usando la calibrazione a un punto (consultare Calcolo dei risultati di seguito).

Per preparare la curva standard, tracciare su un grafico l'assorbanza ottenuta per ogni standard a fronte della rispettiva concentrazione proteica in mg/dl.

Se si usa il metodo del calcolo per determinare la concentrazione proteica dei campioni sconosciuti, utilizzare lo standard che si avvicina alla concentrazione del campione che si sta analizzando; ad es., quando si analizzano campioni di FCS normali misurare lo standard da 50 mg/dl e quando si analizzano campioni di urina normali misurare lo standard da 25 mg/dl. Se la concentrazione proteica del campione è superiore o inferiore a queste concentrazioni, utilizzare lo standard che si avvicina di più alla concentrazione proteica del campione.

La proteina può essere misurata usando campioni di 20 o 50 µl. Il campione di 50 µl dà un range lineare a 150 mg/dl di proteina. Per estendere il range di linearità del metodo di analisi a 350 mg/dl di proteina, utilizzare un campione di 20 µl (consultare la sezione Limiti di seguito).

Procedura di analisi
1. Attendere che il reagente quanTtest red, gli standard, i controlli e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (18 - 25 C).

2. Etichettare le provette di analisi per ciascun campione: bianco reagente, standard, controlli e campioni paziente da analizzare.

I seguenti simboli vengono impiegati nelle confezioni di reattivi di Quantimetrix Corporation.

CE	LOT		IVD		Cont.	REF	⚠	EC REP		
Conformità europea	Numero di lotto	Fabbricato da	Per uso diagnostico in vitro	Rischio biologico	Contenuto della confezione	Catalogo n.	Vedere il foglietto illustrativo del prodotto	Rappresentante autorizzato	Conservar a	Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese)

Quantimetrix 2005 Manhattan Beach Blvd. Redondo Beach CA 90278-1205 USA • +1.310.536.0006 FAX +1.310.536.9977 • www.4qc.com • **MO21022A-12/10**

3. Pipettare 50 µl (20 µl) di ciascun campione nella provetta appropriata. Usare acqua distillata o deionizzata per la provetta del bianco reagente.
4. Pipettare accuratamente 2,5 ml di reagente in ciascuna provetta. Miscelare bene su vortex o agitando le provette.
5. Lasciare che la miscela di reazione rimanga a temperatura ambiente per almeno 15 minuti prima di leggere A_{600}. Il colore della miscela di reazione rimane stabile per 60 minuti.
6. Trasferire il bianco reagente in una cuvetta pulita e regolare lo spettrofotometro in modo che legga zero a 600 nm.
   NOTA: se la cuvetta si colora nel punto 6, il colorante ha adsorbito sul vetro e deve essere pulito per evitare di ottenere risultati erroneamente elevati. Dopo la pulizia, sciacquare accuratamente con acqua distillata o deionizzata e asciugare. Ripetere il punto 6.
7. Leggere ciascun campione a fronte del bianco reagente e annotare i valori di assorbanza ottenuti.
8. Se si utilizza la curva standard, tracciare in un grafico l'assorbanza di ciascuno standard a fronte della concentrazione proteica sulla carta millimetrata fornita. Tracciare una linea retta tra i punti. Determinare la concentrazione proteica dei campioni paziente sconosciuti individuando i valori di assorbanza sulla curva standard e leggendo le corrispondenti concentrazioni proteiche. Se si calcolano i risultati, seguire l'esempio nella sezione Calcolo dei risultati di seguito.

Metodi con gli strumenti automatici
Il sistema di analisi della proteina totale quanTtest red è stato valutato per l'efficacia quando ogni reazione viene letta a intervalli di 3 minuti precisi, il che rende il metodo adatto all'uso su strumenti automatici. Fare riferimento alle applicazioni specifiche dello strumento per il metodo con rosso pirogallolo per istruzioni sull'uso del prodotto. Per informazioni su queste applicazioni, rivolgersi al dipartimento di assistenza tecnica di Quantimetrix o al produttore dello strumento.

Calcolo dei risultati
Le concentrazioni di proteina dell'urina o nell'FCS sono espresse in mg/dl. La concentrazione proteica di campioni sconosciuti può essere determinata individuando l'assorbanza del campione sulla curva standard e leggendo la concentrazione proteica corrispondente **OPPURE** può essere calcolata come segue.

Calcolo della proteina totale
Usare la seguente formula per calcolare le concentrazioni proteiche dei campioni dei pazienti.

Concentrazione proteica (mg/dl) = assorbanza del campione X Concentrazione dello std. (mg/dl)
assorbanza dello standard

I seguenti esempi sono solo a scopo illustrativo.

Fluido cerebrospinale

Campione di FCS del paziente A_{600}	= 0,200
50 mg/dl Standard A_{600}	= 0,310
(0,200 / 0,310) X 50 mg/dl	= 32,3 mg/dl

Urina

Campione di urina del paziente A_{600}	= 0,120
25 mg/dl Standard A_{600}	= 0,165
(0,120 / 0,165) X 25 mg/dl	= 18,2 mg/dl

Calcolo della proteinuria delle 24 ore
1. Misurare il volume dell'urina delle 24 ore (ml).
2. Dividere questo volume per 100 per determinare il volume espresso in decilitri (dl).
3. Moltiplicare il volume dell'urina delle 24 ore in dl per la concentrazione proteica in mg/dl determinata con la procedura quanTtest red.
4. Il numero ottenuto è la quantità di proteina espressa in mg per 24 ore.

Il seguente esempio è solo a scopo illustrativo.

Volume dell'urina del paziente	= 1,550 ml
Proteinuria del paziente	= 18,2 mg/dl
(1550 ml / 100 ml/dl) X 18,2 mg/dl	= 282,1 mg/24 ore

Controllo qualità
Si raccomanda che tutti i laboratori clinici dispongano di un programma di controllo qualità. Si raccomanda di analizzare il materiale di controllo con i valori dei test sia nei range normali che in quelli anomali per monitorare l'esecuzione della procedura. I valori recuperati per i controlli devono rientrare nel range accettabile del laboratorio. È disponibile un programma di controllo qualità Quantimetrix, quantrol™. Sono disponibili informazioni su richiesta.

Limiti
La linearità del metodo di analisi è 150 mg/dl di proteina totale quando si usa un campione di 50 µl. La linearità può essere estesa riducendo il volume del campione a 20 µl. La concentrazione proteica totale quindi diventa lineare a 350 mg/dl. Si può ottenere una maggiore accuratezza diluendo i campioni di livelli proteici più elevati a circa 100 mg/dl con acqua distillata o deionizzata, ripetendo l'analisi e compensando il fattore di diluizione quando si calcola la concentrazione proteica totale.

Alcuni tipi di agenti di superficie possono alterare il colore. I surfattanti cationici in genere danno lo stesso colore delle proteine. Poiché gli anioni inibiscono la reazione del colore, lavare accuratamente le apparecchiature con acqua distillata, in modo da eliminare del tutto gli agenti di superficie. Asciugare bene le apparecchiature prima dell'uso.

L'emoglobina genera una reazione di colore dimezzata rispetto all'albumina. I campioni che manifestano ematuria daranno un risultato elevato falso.

Gli ioni di rame e di ferro possono causare errori nella misurazione. Occorre prestare particolare attenzione a evitare la contaminazione dell'apparecchiatura.

Il reagente contiene componenti sensibili alla luce. Proteggerlo dalla luce.

Il sistema quanTtest red può sottovalutare le proteine a basso peso molecolare e le catene immunoglobuliniche leggere (proteine di Bence Jones).

Nell'uso di routine, accade raramente che le cuvette, le provette per coltura e le apparecchiature si colorino. Tuttavia, quando si analizzano numerosi campioni contemporaneamente e se si analizza un campione contenente un'elevata concentrazione di proteina, una parte di colorante può rimanere. In tal caso, pulire bene i contenitori di vetro e l'apparecchiatura.

Aggiornamenti tecnici sono ottenibili dal nostro sito web.

Valori attesi
I range normali possono variare in base alla popolazione dei pazienti e delle condizioni del laboratorio. È opportuno che ogni laboratorio determini il proprio range normale. Usando il metodo con rosso pirogallolo su campioni ottenuti da soggetti clinicamente sani, si possono prevedere livelli proteici nel fluido cerebrospinale compresi in un range che varia da 15 a 45 mg/dl e che raggiunge 60 mg/dl in soggetti anziani sani. L'escrezione urinaria di proteina è normalmente inferiore a 200 mg/24 ore in volumi di 1.000 – 1.500 ml/24 ore. I campioni di urina normali casuali possono variare da 0 a 20 mg/dl di proteina.

Caratteristiche di esecuzione specifiche

Specificità
La specificità del metodo di analisi quanTtest red è stata determinata mediante l'analisi di campioni di urina ai quali sono state aggiunte sostanze potenzialmente interferenti. È stato rilevato che l'emoglobina e gli ioni di rame o di ferro creano interferenza. Fare riferimento alla tabella delle sostanze interferenti qui sotto.

Tabella delle sostanze interferenti

Additivo Nome	Conc. aggiunta (mg/dl)	Conc. misurata di proteina totale (mg/dl)	Quantità normalmente presente nell'urina
Nessuno	—	29	—
Azoto ureico	2.300	29	10,5 g/giorno
Acido urico	300	30,5	250-750 mg/giorno
Creatinina	300	28,5	uomo 1000-1700 mg/giorno donna 1175-1468 mg/giorno
Ammoniaca	250	30	0,41 – 0,82 g/giorno
Glucosio	5.000	28	30 -130 mg/giorno
Acido ascorbico	200	28,5	0,1 – 0,4 mg/kg/giorno
Glutatione	50	29	—
Acido citrico	200	29,5	0,3 – 0,9 mg/giorno
Acido ossalico	100	26	15 -30 mg/giorno
Acido tartarico	200	28	—
Na	600	30	6 – 8,4 g/giorno
K	250	28	1,8 - 2 g/giorno
Cl	1.000	30	11,1 – 18,2 g/giorno
Ca	100	30	240 - 320 mg/giorno
Mg	30	29	70 -155 mg/giorno
P	200	33	—
Cu	10	39	250 µg/giorno
Fe^{2+}	10	36,5	60 -100 µg/giorno
Bilirubina	20	30,5	3,08 ± 0,28 mg/giorno

Precisione
La precisione del sistema quanTtest red è stata determinata analizzando una serie di Controlli dell'urina e del fluido spinale Quantimetrix. Il test è stato calibrato con standard Quantimetrix includere kit. La reazione è stata letta a 3 minuti e dopo 15 minuti su uno spettrofotometro Gilford Stasar II.

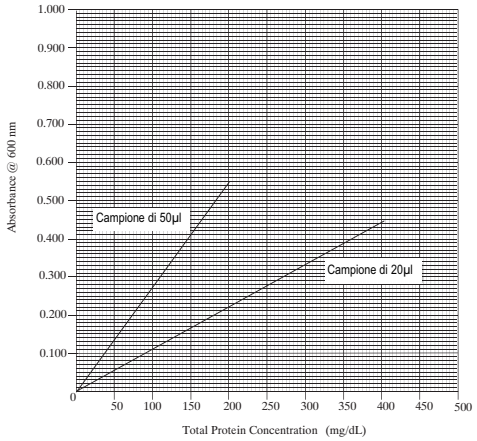
Quando è stata letta a 3 minuti:

	Intranalisi (n=10)			Interanalisi (n=18)		
	Media (mg/dl)	DS	%CV	Media (mg/dl)	DS	%CV
Urina Livello 1	15,3	2,3	14,9	14,9	1,3	8,7
Urina Livello 2	62,5	2,5	4,0	61,8	2,5	4,1
FCS Livello 1	36,3	2,9	7,9	35,3	3,3	9,4
FCS Livello 2	66,7	2,1	3,2	65,2	3,3	5,1

Quando è stata letta dopo 15 minuti:

	Intranalisi (n=10)			Interanalisi (n=18)		
	Media (mg/dl)	DS	%CV	Media (mg/dl)	DS	%CV
Urina Livello 1	15,2	0,4	2,6	15,5	1,3	7,5
Urina Livello 2	63,3	3,0	4,8	62,8	1,9	3,1
FCS Livello 1	36,7	2,6	7,2	35,9	3,4	9,5
FCS Livello 2	69,6	2,6	3,7	68,0	2,6	3,9

Grafico di esempio



Correlazione
Il confronto tra il metodo quanTtest red e il metodo con blu Coomassie (Quantimetrix) per la determinazione della proteina dà la seguente correlazione quando l'analisi viene eseguita usando 29 campioni di urina di paziente.

n=29	Media	Coefficiente di correlazione (r)	Discesa	Intersezione
Blu Coomassie	43,04	0,9923	1,05	-0,18
quanTtest red	45,20			

Letteratura di riferimento

1. Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. CV Mosby Co, 1987.
2. Fujita Y, Mori I, Kitano S. Bunseki Kagaku 1983;32:379.
3. Lievens MM, Celis PJ. Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine. Clin Chem 1982;28:2328.
4. Muir A, Hensley WJ. Pseudoproteinuria due to penicillins in the turbidimetric measurement of proteins with trichloroacetic acid. Clin Chem 1979;25:1662-1663.
5. Young GS et al. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1975;21:1D.
6. Martin EW. Hazard of Medication (Alexander SF, Farage, DJ, Hassan WE Jr. eds.) Philadelphia PA and Toronto Canada: JB Lippincott Co 1971:169-189.
7. Constantino NV, Kabat HF. Drug-induced modification for laboratory test values, revised 1973. Am J Hosp Pharm 1973;30:24.
8. Watanabe N, Makino K, Kamei S, Okubo A, Yamanaka M, Osawa S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
9. Yoshizaki H, Osawa S, Furuya S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 1976;72:248.
11. Kingsbury FB, Clark CP, Williams G, Post AL. J Lab Clin Med 1926;11:981.
12. Meulemans O. Clin Chem, Acta 1960;5:757.
13. Saito M, Kitamura M, Niwa M. Rinsho-kagaku-bunseki II. Tokyo Kagakudojin 1979:21.

QuanTtest Red Total Protein Assay System — Pyrogallol Red

LOT 21220 | REF 5210-12 | IVD | 2013-12 | CE

Uso previsto
El sistema de análisis de proteínas totales quanTtest red se utiliza para la determinación cuantitativa de proteínas en el líquido cefalorraquídeo y en orina, para los sistemas manual y automático.

Resumen y explicación
La determinación de proteínas totales en orina y líquido cefalorraquídeo es útil para el diagnóstico de trastornos renales y del sistema nervioso central, respectivamente. Los aumentos de las proteínas en orina pueden observarse normalmente en las siguientes condiciones: ejercicio extenuante, fiebre e hipotermia, gammopatías monoclonales, nefritis, nefrosis y nefropatía diabética, e infecciones del tracto urinario. La determinación de proteínas totales en el líquido cefalorraquídeo es útil para el diagnóstico de condiciones como meningitis, encefalitis, poliomielitis, neurosífilis, tumores del sistema nervioso central y hemorragias cerebrales[1].

El sistema de análisis proteínas totales quanTtest red es un método simple de cuantificación de proteínas utilizando muestras en microlitros de orina o líquido cefalorraquídeo. Las proteínas totales se miden con el método de tinción utilizando un complejo de rojo pirogallol y ácido molibdénico (Mo^{+6}) descrito por Fujita y cols.[2] Con un pH bajo, el tinte es rojo y cambia a azul cuando se le mezclan proteínas.

Según el equipo y tamaño de muestra utilizados, se alcanza una respuesta lineal de hasta 350 mg/dl. El método de tinción con rojo pirogallol puede leerse a los tres minutos, lo que hace que la prueba sea adecuada para el instrumental automático. La sensibilidad del método de tinción con rojo pirogallol hace que la prueba sea adecuada para uso con fluidos corporales, como el líquido cefalorraquídeo y la orina, que tienen concentraciones proteínicas demasiado bajas para poder realizar una medición precisa con otros métodos proteínicos.

El método Biuret no es lo suficientemente sensible para la determinación de proteínas en orina. Los resultados con los métodos turbidimétricos pueden variar según el tipo y la concentración del precipitante, el tipo de proteína, la temperatura y el tiempo antes de la lectura. Se ha demostrado que algunos fármacos interfieren con los métodos turbidimétricos[3,4] . El método quanTtest red tiene una gama más amplia de linealidad que el método Azul de Coomassie.

La globulina y la albúmina pueden medirse con el reactivo quanTtest red. Los surfactantes y los iones de cobre o hierro interfieren con los resultados de las pruebas. Las muestras con hematuria darán resultados falsamente altos. Este método reduce la tinción de la cubeta y puede adaptarse a los analizadores automáticos.

Principio del procedimiento
El ensayo está basado en la interacción de la proteína con el complejo rojo pirogallol-molibdato. El rojo pirogallol se combina con el ácido molibdénico en el reactivo, formando un complejo rojo con una absorbancia máxima a 470 nm. Bajo las condiciones de la prueba, en presencia de proteína se forma un color azul-púrpura y la absorción máxima del tinte cambia de 470 a 604 nm. La concentración de la proteína total de la muestra puede medirse leyendo la absorbancia de la muestra a 600 nm. La respuesta del color es lineal y permite determinaciones precisas de proteína.

Reactivos
1. El **reactivo** quanTtest red se suministra como líquido listo para su uso, en frascos de 250 ml con rojo de pirogallol (0,020 g/l), molibdato sódico (0,06 g/l), ácido succínico (4,8 g/l), benzoato sódico (0,4 g/l), oxalato sódico (0,25 g/l), metanol (12 ml/l) y surfactante.
2. **Un Juego de solucion de estandar de Proteina** envasado en frascos cuentagotas de 30 ml, se suministra en cuatro concentraciones proteínicas de 25, 50, 100 y 200 mg/dl, como solución acuosa de albúmina sérica humana al 70% y globulina sérica humana al 30% en solución salina tamponada con borato. (Véase el prospecto adjunto Estándares de proteínas humanas.) Se ha añadido azida sódica como conservante.
3. **Controles de líquido cefalorraquídeo**, concentraciones 1 y 2, suministrado en frascos de 3 ml. (Véase el prospecto adjunto Control del líquido cefalorraquídeo.) Se ha añadido azida sódica como conservante.
4. **Controles de orina humana**, concentraciones 1 y 2, suministrado en frascos de 10 ml. (Véase el prospecto adjunto Control de orina.) Se ha añadido azida sódica como conservante.
5. **Papel para gráficas**
6. **Prospecto de instrucciones** (aplicable a los productos enumerados a continuación)

Producto	Nº de catálogo	Contenido
Reactivo quanTtest red	5210-12	1 x 250 mL
Sistema de proteínas totales quanTtest red	2210-02	200 Prueba
Reactivo		2 x 250 ml
Estándar 25, 50, 100, 200 mg/dl		1 x 30 ml cada uno
Control del líquido cefalorraquídeo, concentraciones 1 y 2		1 x 3 ml cada uno
Control de orina, concentraciones 1 y 2		1 x 10 ml cada uno

Material necesario pero no suministrado
1. Pipetas capaces de administrar 20 µl o 50 µl, y 2,5 ml.
2. Tubos de reacción: se recomiendan tubos de cultivo de 13 x 100 mm.
3. Espectrofotómetro capaz de leer la absorbancia a 600 nm.
4. Cubeta: vidrio o plástico desechable.
5. Agua destilada o desionizada.

Instrumental
El sistema de análisis de proteínas totales quanTtest red requiere el uso de un espectrofotómetro manual o automatizado, capaz de medir la absorbancia a 600 nm. Consulte el manual del fabricante del instrumento para obtener instrucciones específicas sobre su funcionamiento y uso. Pueden obtenerse las aplicaciones automatizadas del analizador poniéndose en contacto con el departamento de servicio técnico de Quantimetrix.

Sólo para uso en diagnóstico *in vitro*

Advertencias y precauciones
El reactivo quanTtest red está formulado con metanol acídico. No ingerir. Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. En caso de contacto, lavarse inmediatamente los ojos con agua y obtener atención médica. Lavarse la piel con jabón y agua. No pipetear con la boca.

Los estándares y controles están formulados con material de origen humano. Se han estudiado todas las unidades de donantes de sangre que forman el material de origen de los sueros y no se ha encontrado reacción frente al virus de la hepatitis C, el antígeno de superficie de la hepatitis B, ni a los anticuerpos del VIH cuando se utilizaron métodos aceptados por la FDA. **MATERIAL BIOLÓGICO POTENCIALMENTE PELIGROSO**. Ningún método de análisis conocido puede garantizar que un producto derivado de la sangre humana no contenga el virus de hepatitis o VIH. Se recomienda manejar estas muestras de acuerdo con las recomendaciones de seguridad biológica de nivel 2 de los Centers for Disease Control.

Elimine todo material desechable de acuerdo con las normativas locales vigentes sobre la gestión de residuos.

Reconstitución de los reactivos
Reactivo
El reactivo quanTtest red no necesita reconstitución ni dilución. Saque el reactivo del frigorífico y separe la cantidad suficiente para el número de pruebas que deban realizarse. Deje que la cantidad separada se estabilice a temperatura ambiente (18 - 25 C) antes del uso.

Estándares y controles
Extraiga los estándares y controles del frigorífico y déjelos estabilizar a temperatura ambiente (18 - 25 C) durante aproximadamente 30 minutos antes de su uso. Los estándares y controles no necesitan reconstitución. Invierta suavemente los estándares y controles para garantizar la homogeneidad del contenido. Evite la formación de espuma.

Almacenamiento y estabilidad
Reactivo
1. Almacenar el reactivo quanTtest red a 2 - 8 C, herméticamente cerrado. Protegerlo de la luz.
2. Cuando se almacena correctamente, el reactivo permanece estable hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta. No utilizar los reactivos una vez transcurrida la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de cada reactivo.
3. Desechar el reactivo si se han formado precipitados o está turbio.

Estándares y controles
1. Los estándares y controles deben almacenarse a 2 - 8 C.
2. Cuando se almacenan a 2 - 8 C entre usos, los estándares y controles permanecen estables hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta. No utilizar los estándares y controles una vez transcurrida la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
3. Desechar los estándares y controles si tienen un aspecto turbio o si presentan signos de contaminación microbiana.

Manejo de las muestras
1. Extraer las muestras del frigorífico y dejarlas estabilizar a temperatura ambiente (18 - 25 C) antes de la prueba.
2. Las muestras de orina o líquido cefalorraquídeo pueden ser adecuadas para su uso sin preparación adicional previa. No se requieren conservantes especiales.
3. En caso de observarse células sanguíneas o restos celulares en la muestra de orina o de líquido raquídeo, éstas deben centrifugarse antes de la prueba.
4. Las proteínas en orina pueden determinarse en una muestra de recogida de 24 horas o en una muestra aleatoria.
5. Las muestras de orina pueden almacenarse a 2 - 8 C hasta 24 horas, o congeladas hasta 3 meses, hasta el momento de la prueba. Las muestras de líquido cefalorraquídeo pueden almacenarse a 2 - 8 C durante varios días, o congeladas hasta el momento de la prueba.

Procedimiento
La concentración proteínica de las muestras desconocidas puede determinarse hallando la absorbancia de las mismas en una curva estándar y leyendo la concentración proteínica correspondiente, o bien puede calcularse mediante una calibración de un punto (véase Cálculo de los resultados, más abajo).

Para preparar la curva estándar, trace la absorbancia obtenida para cada estándar contra su concentración proteínica respectiva en mg/dl.

Si utiliza el método de cálculo para determinar la concentración proteínica de las muestras desconocidas, tome el estándar que más se aproxime a la concentración de la muestra objeto de análisis, es decir, cuando analice muestras de líquido cefalorraquídeo normales, mida el estándar de 50 mg/dl, y cuando analice muestras de orina normales, el de 25 mg/dl. Si la concentración proteínica de la muestra es superior o inferior a estas concentraciones, utilice el estándar que se aproxime más a la concentración proteínica de la muestra.

Las proteínas pueden medirse utilizando una muestra de 20 o 50 µl. La muestra de 50 µl dará un intervalo lineal para 150 mg/dl de proteínas. Para aumentar el intervalo de linealidad del método de análisis a
350 mg/dl de proteínas, utilice una muestra de 20 µl (véase la sección Limitaciones, más abajo).

Procedimiento de la prueba
1. Deje que el reactivo quanTtest red, los estándares, controles y muestras, se estabilicen a temperatura ambiente (18 - 25 C).

Los siguientes símbolos se emplean en los estuches de reactivos para de Quantimetrix Corporation.

CE	LOT		IVD		Cont.	REF		EC REP		
Conformidad europea	Denominación de lote	Fabricado por	De uso diagnóstico in vitro	Peligro biológico	Contenido del estuche	Nº de catálogo	Consulte el folleto del producto	Representante autorizado	Conservar a	Estable hasta (ultimo día del mes)

Quantimetrix 2005 Manhattan Beach Blvd. Redondo Beach CA 90278-1205 USA • +1.310.536.0006 FAX +1.310.536.9977 • www.4qc.com • **MO21022A-12/10**

2. Etiquete los tubos de prueba de cada muestra: blanco de reactivo, estándares, controles y muestras de paciente, objeto de la prueba.
3. Pipetee 50 µl (20 µl) de cada muestra en el tubo correspondiente. Utilice agua destilada o desionizada para el tubo de blanco de reactivo.
4. Pipetee con precisión 2,5 ml del reactivo a cada uno de los tubos. Mezcle bien con vórtex o agitando los tubos.
5. Deje estabilizar la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante por lo menos 15 minutos antes de leer el A_{600}. El color de la mezcla de reacción es estable hasta 60 minutos.
6. Transfiera el blanco de reactivo a una cubeta limpia y ajuste el espectrofotómetro para una lectura de cero a 600 nm.
   NOTA: Si la cubeta se tiñe en el paso 6, el tinte se habrá absorbido en el vidrio y deberá limpiarse para no obtener resultados erróneamente altos. Después de limpiarlo, enjuáguelo bien con agua destilada o desionizada, y séquelo. Repita el paso 6.
7. Lea cada muestra contra el blanco de reactivo y registre los valores de absorbancia obtenidos.
8. Para preparar una curva estándar, trace la absorbancia de cada estándar contra su concentración proteínica en el papel para gráficas suministrado. Trace la línea recta de "mejor ajuste" por los puntos. Determine la concentración proteínica de las muestras de paciente desconocidas, hallando las absorbancias en la curva estándar y leyendo las concentraciones proteínicas correspondientes. Para calcular los resultados, siga el ejemplo de la sección Cálculo de resultados, más abajo.

Métodos para instrumental automatizado
Se ha evaluado la eficacia del quanTtest red Total Protein Assay System al leer cada reacción a intervalos precisos de 3 minutos, habiéndose determinado que el método es adecuado para instrumental automatizado. Consulte las aplicaciones del instrumento correspondiente en relación con el método de rojo pirogallol para obtener instrucciones sobre el uso de este producto. Pueden obtenerse estas aplicaciones poniéndose en contacto con el departamento de servicio técnico de Quantimetrix o con el fabricante del instrumento.

Cálculo de resultados
Las concentraciones de proteína en orina o en el líquido cefalorraquídeo están expresadas en mg/dl. La concentración proteínica de las muestras desconocidas puede determinarse hallando la absorbancia de la muestra en la curva estándar y leyendo las concentraciones proteínicas correspondientes, **O BIEN** puede calcularse de la siguiente forma:

Cálculo de las proteínas totales
Utilice la siguiente fórmula para calcular las concentraciones proteínicas de las muestras de paciente.

Concentración proteínica (mg/dl) = absorbancia de la muestra X Concentración del estándar (mg/dl)
absorbancia del estándar

He aquí algunos ejemplos ilustrativos.

Líquido cefalorraquídeo

Muestra de paciente A_{600} del líquido cefalorraquídeo	= 0,200
50 mg/dl Estándar A_{600}	= 0,310
(0,200 / 0,310) X 50 mg/dl	= 32,3 mg/dl

Orina

Muestra de paciente A_{600} de orina	= 0,120
25 mg/dl Estándar A_{600}	= 0,165
(0,120 / 0,165) X 25 mg/dl	= 18,2 mg/dl

Cálculo de las proteínas en orina de 24 horas
1. Mida el volumen de la orina de 24 horas (ml).
2. Divida este volumen por 100 para determinar el volumen expresado en decilitros (dl).
3. Multiplique el volumen de la orina de 24 horas en dl por la concentración proteínica en mg/dl, según el procedimiento quanTtest red.
4. El número resultante es la cantidad de proteínas expresada en mg por 24 horas.

He aquí un ejemplo ilustrativo.

Volumen de orina del paciente	= 1.550 ml
Proteínas en orina del paciente	= 18,2 mg/dl
(1550 ml / 100 ml/dl) X 18,2 mg/dl	= 282,1 mg/24 horas

Control de calidad
Se recomienda un programa de control de calidad para todos los laboratorios clínicos. Se recomienda el análisis del material de control con los valores analizados en los intervalos normal y anormal, para monitorizar el rendimiento del procedimiento. Los valores recuperados de los controles deben estar dentro del intervalo aceptable del laboratorio. Quantimetrix dispone del programa de control de calidad quantrol™. Solicite información.

Limitaciones
La linealidad del método de ensayo es de 150 mg/dl de las proteínas totales utilizando una muestra de 50 µl. La linealidad debe ampliarse disminuyendo el volumen de la muestra a 20 µl. La concentración de proteínas totales será lineal a 350 mg/dl. Puede obtenerse una mayor precisión diluyendo las muestras con concentraciones más altas de proteínas a aproximadamente 100 mg/dl con agua destilada o desionizada, volviendo a realizar el análisis y corrigiendo el factor de dilución al calcular la concentración de proteínas totales.

Algunos tipos de agentes de superficie activos pueden afectar al color. Los surfactantes catiónicos en general dan el mismo color que las proteínas. Dado que los aniones inhiben la reacción del color, lave bien el equipo con agua destilada hasta que no quede ningún agente de superficie activo. Seque bien el equipo antes de su uso.

La hemoglobina da aproximadamente la mitad de reacción del color que la albúmina. Las muestras con hematuria darán resultados falsamente altos.

Los iones de cobre y hierro pueden provocar errores en la medición. Debe tenerse especial cuidado en evitar la contaminación del aparato.

El reactivo contiene componentes fotosensibles, por lo que debe protegerse de la luz.

El sistema quanTtest red puede subestimar las proteínas de bajo peso molecular y las cadenas ligeras de inmunoglobulina (proteínas de Bence Jones).

En un uso rutinario, raras veces se tiñen las cubetas, los tubos de cultivo y el equipo. Si la concentración proteínica de la muestra es superior o inferior a estas concentraciones, utilice el estándar que se aproxime más a la misma. En este caso, limpie bien los utensilios de cristal y el equipo.

Encontrará la información técnica actualizada en nuestro sitio web.

Valores esperados
Los intervalos normales pueden variar según la población de pacientes y las condiciones del laboratorio. Cada laboratorio deberá establecer su propio intervalo normal. Utilizando el método de rojo pirogallol en muestras de sujetos clínicamente sanos, cabe esperar un intervalo de concentraciones proteínicas en el líquido cefalorraquídeo entre 15 y 45 mg/dl, y hasta 60 mg/dl en sujetos sanos de avanzada edad. La excreción urinaria de las proteínas normalmente es inferior a 200 mg/24 horas en volúmenes de 1.000 a 1.500 ml/24 horas. Las muestras de orina normales aleatorias pueden oscilar entre 0 y 20 mg/dl de proteínas.

Características específicas de rendimiento
Especificidad
La especificidad del método de ensayo quanTtest red se determinó mediante el análisis de muestras de orina tras la adición de posibles sustancias interferentes. La hemoglobina y los iones de cobre y hierro son interferentes. Véase la siguiente tabla de sustancias interferentes:

Tabla de sustancias interferentes

Aditivo Nombre	Conc. añadida (mg/dl)	Conc. medida de proteínas totales (mg/dl)	Cantidad normalmente presente en la orina
Ninguna	—	29	—
Nitrógeno de urea	2.300	29	10,5 g/día
Ácido úrico	300	30,5	250-750 mg/día
Creatinina	300	28,5	hombre 1000-1700 mg/día mujer 1175-1468 mg/día
Amoníaco	250	30	0,41 - 0,82 g/día
Glucosa	5.000	28	30 - 130 mg/día
Ácido ascórbico	200	28,5	0,1 - 0,4 mg/kg/día
Glutationa	50	29	—
Ácido cítrico	200	29,5	0,3 - 0,9 mg/día
Ácido oxálico	100	26	15 -30 mg/día
Ácido tartárico	200	28	—
Na	600	30	6 - 8,4 g/día
K	250	28	1,8 - 2 g/día
Cl	1.000	30	11,1 -18,2 g/día
Ca	100	30	240 - 320 mg/día
Mg	30	29	70 - 155 mg/día
P	200	33	—
Cu	10	39	250 µg/día
Fe^{2+}	10	36,5	60 - 100 µg/día
Bilirrubina	20	30,5	3,08 ± 0,28 mg/día

Precisión
La precisión del sistema quanTtest red se estableció analizando una serie de controles de orina de controles de orina de Quantimetrix y de controles fluidos espinales. El ensayo se calibró con estándares de Quantimetrix incluidos en el kit. La reacción se leyó a los 3 minutos y tras 15 minutos en un espectrofotómetro Gilford Stasar II.

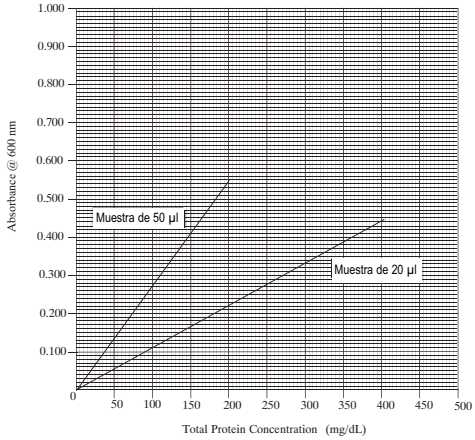
Cuando se lee a los 3 minutos:

	En un mismo ensayo (n=10)			Entre ensayos (n=18)		
	Media (mg/dl)	DT	CV (%)	Media (mg/dl)	DT	CV (%)
Conc. 1 en orina	15,3	2,3	14,9	14,9	1,3	8,7
Conc. 2 en orina	62,5	2,5	4,0	61,8	2,5	4,1
LCR Conc. 1	36,3	2,9	7,9	35,3	3,3	9,4
LCR Conc. 2	66,7	2,1	3,2	65,2	3,3	5,1

Cuando leido despues de 15 minutos:

	En un mismo ensayo (n=10)			Entre ensayos (n=18)		
	Media (mg/dl)	DT	CV (%)	Media (mg/dl)	DT	CV (%)
Conc. 1 en orina	15,2	0,4	2,6	15,5	1,3	7,5
Conc. 2 en orina	63,3	3,0	4,8	62,8	1,9	3,1
LCR Conc. 1	36,7	2,6	7,2	35,9	3,4	9,5
LCR Conc. 2	69,6	2,6	3,7	68,0	2,6	3,9

Gráfica de ejemplo



Correlación
La comparación del método quanTtest red con el método de Azul de Coomassie (Quantimetrix) para la determinación proteínica, proporciona la siguiente correlación cuando se analiza utilizando 29 muestras de orina del paciente.

n=29	Media	Coeficiente de correlación (r)	Pendiente	Intercepción
Azul de Coomassie	43,04			
		0,9923	1,05	-0,18
quanTtest red	45,20			

Bibliografía

1. Pesce AJ, Kaplan LA. Methods in Clinical Chemistry. CV Mosby Co, 1987.
2. Fujita Y, Mori I, Kitano S. Bunseki Kagaku 1983;32:379.
3. Lievens MM, Celis PJ. Drug interference in turbidimetry and colorimetry of proteins in urine. Clin Chem 1982;28:2328.
4. Muir A, Hensley WJ. Pseudoproteinuria due to penicillins in the turbidimetric measurement of proteins with trichloroacetic acid. Clin Chem 1979;25:1662-1663.
5. Young GS et al. Effect of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1975;21:1D.
6. Martin EW. Hazard of Medication (Alexander SF, Farage, DJ, Hassan WE Jr. eds.) Philadelphia PA and Toronto Canada: JB Lippincott Co 1971:169-189.
7. Constantino NV, Kabat HF. Drug-induced modification for laboratory test values, revised 1973. Am J Hosp Pharm 1973;30:24.
8. Watanabe N, Makino K, Kamei S, Okubo A, Yamanaka M, Osawa S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
9. Yoshizaki H, Osawa S, Furuya S. The Japanese Journal of Clinical Pathology 1984;32 suppl:227.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal Biochem 1976;72:248.
11. Kingsbury FB, Clark CP, Williams G, Post AL. J Lab Clin Med 1926;11:981.
12. Meulemans O. Clin Chem, Acta 1960;5:757.
13. Saito M, Kitamura M, Niwa M. Rinsho-kagaku-bunseki II. Tokyo Kagakudojin 1979:21.